

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条（PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付る文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-19

有
無

請求の範囲

進歩性 (I S)

請求の範囲 1-19

有
無

請求の範囲

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1-19

有
無

請求の範囲

2. 文献及び説明

引用文献1 : Liu, Q-R. et al.

"Molecular characterization of four pharmacologically distinct α -aminobutyric acid transporters in mouse brain"
The Journal of Biological Chemistry (1993) Vol. 268 No. 3 P. 2106-2112

引用文献2 : Borden, L. A. et al.

"Molecular heterogeneity of the γ -aminobutyric acid (GABA) transport system"
The Journal of Biological Chemistry (1992) Vol. 267 No. 29 P. 21098-21104

請求の範囲 1-19について

引用文献1には、マウス脳由来の γ -aminobutyric acid (GABA) トランスポーターGAT 3、GAT 4のアミノ酸配列及び遺伝子配列が記載され（引用文献1第2108頁FIG. 1、FIG. 3）、GAT 1、2、3及び4のアミノ酸配列のアライメントが記載されている（引用文献1第2110頁FIG. 4）。

引用文献2には、ラット脳由来のGABAトランスポーターGAT 2及び3のアミノ酸配列が記載されている（引用文献2第21101頁FIG. 2）。

ここで、ある蛋白質をコードする核酸の配列は種間の核酸ハイブリダイゼーションが可能な程度に進化において保存されていることが多いので、引用文献1や2に記載されたアミノ酸配列をもとに、他の動物種であるヒトにおいて対応するGABAトランスポーター遺伝子を取得しようとするることは当業者が容易に想到し得たものと認める。

また、遺伝子が取得された場合に、適当なベクターに組み込み宿主を形質転換して蛋白質を製造すること、蛋白質に対する抗体を作製すること、製造された蛋白質を用いてGABAトランスポーター活性の促進または阻害化合物をスクリーニングすることは当業者が周知の技術を用いてなし得たことである。

従って、請求の範囲1乃至19に係る発明は引用文献1や2の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

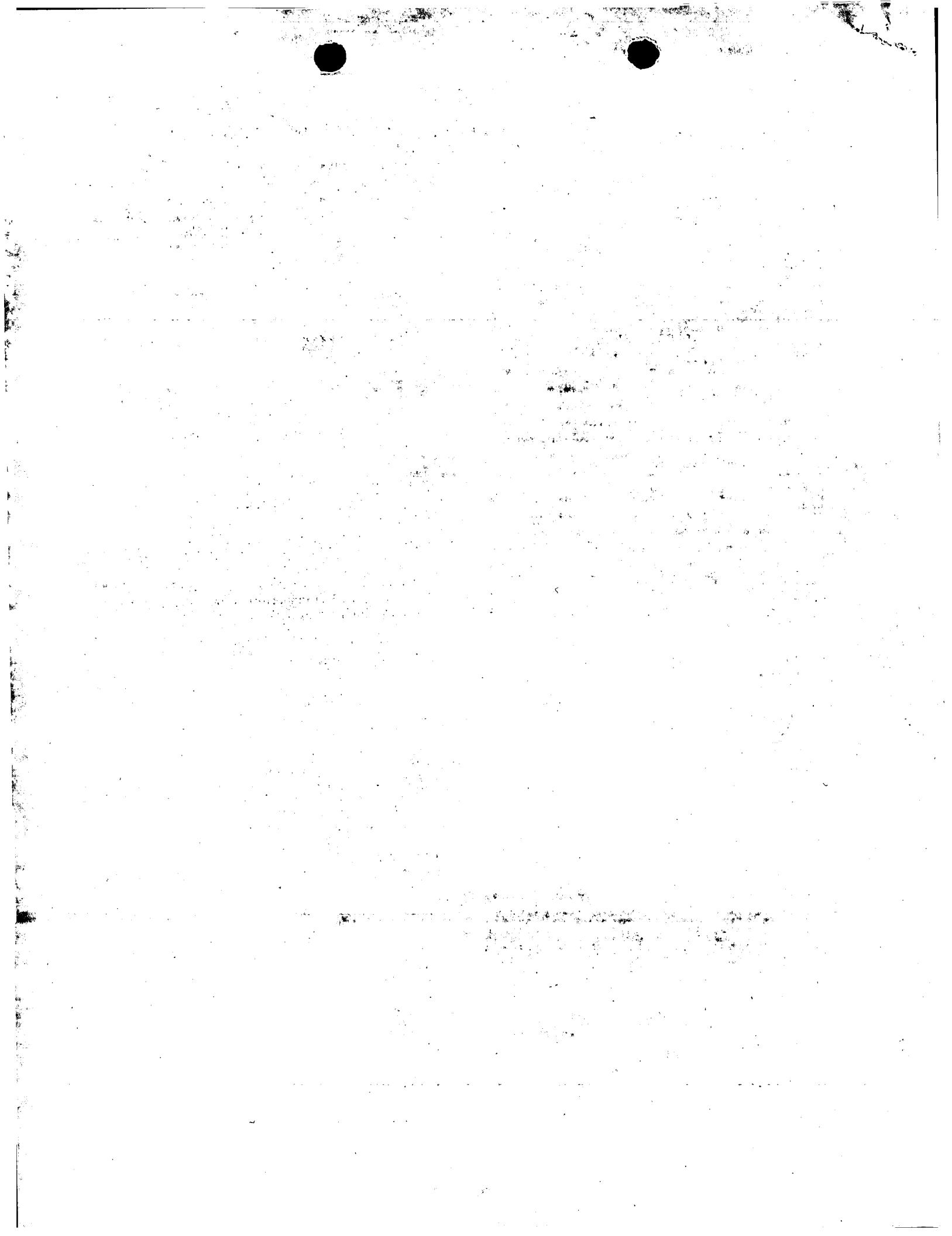
VIII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

一般に、所望の性質を特定することのみで、その性質を有する化合物 자체を把握することは困難であるため、化学構造等の有効成分を得るための手がかりが記載されていない明細書は、発明の実施に必要な有効成分の入手過程において、無数の化合物を製造、スクリーニングして、当該性質を有するか否かを確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を求めるものであり、当業者が発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されていないものと判断される。

これを本願明細書についてみると、GABAトランスポーター活性を促進あるいは阻害する化合物を識別するためのスクリーニング方法は記載されているものの、該方法により得られた化合物の具体例が記載されておらず、また、有効成分を得るための化学構造等の手がかりが記載されておらず、かつ、それが出願時に当業者に推認できたものとも認められないので、請求項に包含される有効成分を当業者が理解できず、当業者の実施にあたり、無数の化合物を製造、スクリーニングして確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を求めるものである。

したがって、発明の詳細な説明は、請求の範囲14乃至19係る発明を当業者が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。



特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

あて名

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

PCT/JP00/03720

PE402

P C T

国際予備審査請求書
の受理通知書

受付
00.9.28

知的財産部

（法施行規則第54条第1項）
〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、
実施細則601(a)〕

発送日（日、月、年）

26.09.00

出願人又は代理人 の書類記号	2613WOOP	重 要 な 通 知
国際出願番号 PCT/JP00/03720	国際出願日（日、月、年） 08.06.00	優先日（日、月、年） 10.06.99
出願人（氏名又は名称） 武田薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したこと通知する。

14日09月00年

2. この受理の日は次に示す日である。

- 管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日
(PCT規則61.1(b))
- 管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日
(PCT規則59.3(e))
- 国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

3. 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条（1））したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）
詳細については、「PCT出願人の手引き・第II巻」を参照すること。

- この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308 日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 様式PCT/IPEA/402 (1998年7月)	権限のある職員 特許庁長官
---	------------------

THIS PAGE BLANK (USPTO)

担当者	G・M	Pat・M	審長
特許協力条約			

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番8号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

殿

00.11.26 PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)
(PCT規則44.1)

発送日
(日.月.年) 26.09.00

受付

00.9.28

知的財産部

出願人又は代理人 の書類記号 2613WOOP	今後の手続きについては、下記1及び4を参照。
国際出願番号 PCT/JP00/03720	国際出願日 (日.月.年) 08.06.00
出願人（氏名又は名称） 武田薬品工業株式会社	

- 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出
出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる。（PCT規則46参照）。
いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。
詳細については添付用紙の備考を参照すること。
どこへ 直接次の場所へ
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35
詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。
- 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項（PCT17条(2)(a)）の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
- 法施行規則第44条（PCT規則40.2）に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。
 - 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。
 - 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。
4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。
優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。
出願人が優先日から30月まで（官庁によってはもっと遅く）国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。
国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 特許庁長官	4B	9735
電話番号 03-3581-1101 内線 3448			

注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。
3. 文献の写しの請求について

国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

[申込方法]

- (1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。
 - 特許・実用新案及び意匠の種類
 - 出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)
 - 必要部数
- (2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。
 - 国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

[申込み及び照会先]

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル
財団法人 日本特許情報機構 サービス課
TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

PCT19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

補正の対象となるもの

PCT19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT34条の規定に基づく国際予備審査の手続きにおいて請求の範囲を（更に）補正することができます。

明細書及び図面は、PCT34条の規定に基づく国際予備審査の手続きにおいてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT28条（又はPCT41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができます。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を出した／する場合については、以下を参照すること。

どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正是国際公開の言語で行う。

補正書にどのような書類を添付しなければならないか

書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

様式PCT/ISA/220の備考（続き）

次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合]：“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合]：“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合]：“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合]：“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”（PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる（明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない）。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならず、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならず、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性について、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書（及び説明書）を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい（PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照）。詳細は国際予備審査請求書（PCT/IPEA/401）の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳について

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁／選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁／選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

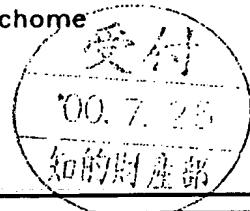
PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

TAKAHASHI, Shuichi
 Osaka Plant of Takeda Chemical
 Industries, Ltd.
 17-85, Jusohonmachi 2-chome
 Yodogawa-ku
 Osaka-shi
 Osaka 532-0024
 JAPON



Date of mailing (day/month/year) 13 July 2000 (13.07.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2613WOOP	International application No. PCT/JP00/03720

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (for all designated States except US)
 KIMURA, Hiroyuki et al (for US)

International filing date : 08 June 2000 (08.06.00)
 Priority date(s) claimed : 10 June 1999 (10.06.99)
 Date of receipt of the record copy by the International Bureau : 23 June 2000 (23.06.00)

List of designated Offices :

AP : GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW
 EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
 EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
 OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
 National : AE,AG,AL,AM,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CN,CR,CU,CZ,DM,DZ,EE,GD,GE,HR,HU,ID,
 IL,IN,IS,JP,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MX,MZ,NO,NZ,PL,RO,RU,SG,SI,SK,
 TJ,TM,TR,TT,UA,US,UZ,VN,YU,ZA

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- time limits for entry into the national phase
- confirmation of precautionary designations
- requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: Shinji IGARASHI Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the "Notification of Receipt of Record Copy" (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

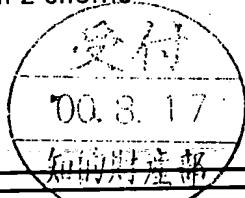
NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 03 August 2000 (03.08.00)
Applicant's or agent's file reference 2613WOOP
International application No. PCT/JP00/03720
International publication date (day/month/year) Not yet published
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al

To:

TAKAHASHI, Shuichi
 Osaka Plant of Takeda Chemical
 Industries, Ltd.
 17-85, Jusohonmachi 2-chome.
 Yodogawa-ku
 Osaka-shi
 Osaka 532-0024
 JAPON



IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year) 08 June 2000 (08.06.00)
Priority date (day/month/year) 10 June 1999 (10.06.99)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt; or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
10 June 1999 (10.06.99)	11/163924	JP	27 July 2000 (27.07.00)

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland
 Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer
 Marc Salzman
 Telephone No. (41-22) 338.83.38

003447563

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year) 21 December 2000 (21.12.00)
Applicant's or agent's file reference 2613WOOP

To:

TAKAHASHI, Shuichi
 Osaka Plant of Takeda Chemical
 Industries, Ltd.
 17-85, Jusohonmachi 2-chome
 Yodogawa-ku
 Osaka-shi
 Osaka 532-0024
 JAPON

**IMPORTANT NOTICE**

International application No. PCT/JP00/03720	International filing date (day/month/year) 08 June 2000 (08.06.00)	Priority date (day/month/year) 10 June 1999 (10.06.99)
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al		

- Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AG,AU,DZ,KR,MZ,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

- The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AL,AM,AP,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CN,CR,CU,CZ,DM,EA,EE,EP,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,IS,
JP,KG,KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,OA,PL,RO,RU,SG,SI,SK,TJ,TM,TR,TT,
UA,UZ,VN,YU,ZA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

- Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 21 December 2000 (21.12.00) under No. WO 00/77045

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
 Osaka Plant of Takeda Chemical
 Industries, Ltd.
 17-85, Jusohonmachi 2-chome
 Yodogawa-ku
 Osaka-shi
 Osaka 532-0024
 JAPON

Date of mailing (day/month/year)

21 December 2000 (21.12.00)

Applicant's or agent's file reference

2613WOOP

IMPORTANT INFORMATION

International application No.

PCT/JP00/03720

International filing date (day/month/year)

08 June 2000 (08.06.00)

Priority date (day/month/year)

10 June 1999 (10.06.99)

Applicant

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP :GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW

EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE

National :AG,AU,BG,CA,CN,CZ,DZ,IL,JP,KR,MN,MZ,NO,NZ,PL,RO,RU,SK,US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA :AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM

OA :BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG

National :AE,AL,AM,AZ,BA,BB,BR,BY,CR,CU,DM,EE,GD,GE,HR,HU,ID,IN,IS,KG,KZ,
LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MX,SG,SI,TJ,TM,TR,TT,UA,UZ,VN,YU,ZA

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer:

J. Zahra

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/22 第2
PCT

特許協力条約

特許事務局
受付窓口

236回
(2001年6月17日) 3

発信人 日本国特許庁(受理官庁)

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-8.5
武田薬品工業株式会社知的財産部

PCT/JP00/03720

RO105

P C T

国際出願番号及び
国際出願日の通知書

受付

(法施行規則第22条、第23条
(PCT規則20.5(c)))

00.6.22

知的財産部

出願人又は代理人 の書類記号		発送日(日、月、年)	
2613WOOP		重 要 な 通 知	
国際出願番号 PCT/JP00/03720	国際出願日(日、月、年) 08.06.00	優先日(日、月、年) 10.06.99	
出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社			

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、20日06月00年に国際事務局に送付した。

注 意

- a. 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード(日本の場合JP)、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- b. 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- c. あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- d. 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- e. この通知に記載された出願人のあて名、氏名(名称)に誤りがあるときは申出により訂正します。
- f. 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知(様式PCT/IB/301)する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名	権限のある職員
日本国特許庁(RO/JP) 郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308 日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 様式PCT/RO/105(1999年7月)	特許庁長官

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約に基づく国際出願

願書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

受理官庁記入欄	
国際出願番号	
国際出願日	
PCT	
08.6.00	
(受付印)	
受領印	

出願人又は代理人の書類記号
(希望する場合、最大12字)

2613WOOP

第I欄 発明の名称

新規タンパク質およびそのDNA

第II欄 出願人

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

武田薬品工業株式会社

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

〒541-0045 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,
OSAKA 541-0045 JAPAN

この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電信番号:

国籍(国名): 日本国 Japan

住所(国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: すべての指定国 米国を除くすべての指定国 米国のみ 追記欄に記載した指定国

第III欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、
次に該当する:

 出願人のみである。 出願人及び発明者である。

発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 Japan

住所(国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: すべての指定国 米国を除くすべての指定国 米国のみ 追記欄に記載した指定国

 その他の出願人又は発明者が統葉に記載されている。

第IV欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

 代理人 共通の代表者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

電話番号:

03-3278-2235

11404 弁理士 高橋秀一 TAKAHASHI Shuichi

ファクシミリ番号:

03-3278-2222

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

加入電信番号:

c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,
OSAKA 532-0024 JAPAN 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

第三欄の続き その他の出願人又は発明者

この統葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

坂本潤一 SAKAMOTO Junichi
 〒565-0085 日本国大阪府豊中市上新田1丁目14番地の30 フレグ
 ランスA103号室
 Fureguransu A103, 14-30, Kamishinden 1-chome, Toyonaka-shi,
 OSAKA 565-0085 JAPAN

- この欄に記載した者は、
次に該当する：
- 出願人のみである。
 - 出願人及び発明者である。
 - 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍（国名）： 日本国 Japan

住所（国名）： 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である：

- すべての指定国
- 米国を除くすべての指定国
- 米国のみ
- 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

澤田秀和 SAWADA Hidekazu
 〒572-0806 日本国大阪府寝屋川市大字高宮531番地
 531, Oaza-takamiya, Neyagawa-shi, OSAKA 572-0806 JAPAN

- この欄に記載した者は、
次に該当する：
- 出願人のみである。
 - 出願人及び発明者である。
 - 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍（国名）： 日本国 Japan

住所（国名）： 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である：

- すべての指定国
- 米国を除くすべての指定国
- 米国のみ
- 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

- この欄に記載した者は、
次に該当する：
- 出願人のみである。
 - 出願人及び発明者である。
 - 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である：

- すべての指定国
- 米国を除くすべての指定国
- 米国のみ
- 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

- この欄に記載した者は、
次に該当する：
- 出願人のみである。
 - 出願人及び発明者である。
 - 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である：

- すべての指定国
- 米国を除くすべての指定国
- 米国のみ
- 追記欄に記載した指定国

 その他の出願人又は発明者が他の統葉に記載されている。

第Ⅴ欄 国の指定

規則 4. 9(a) の規定に基づき次の指定を行う（該当する□に印を付すこと；少なくとも1つの□に印を付すこと）。

広域特許

- AP ARIPO特許 : GH ガーナ Chana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SL シエラ・レオーネ Sierra Leone, SZ スワジランド Swaziland, TZ タンザニア United Republic of Tanzania, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国
- EA ヨーラシア特許 : AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びヨーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- EP ヨーロッパ特許 : AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- OA OAPI特許 : BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサオ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機関のメンバ一国と特許協力条約の締約国である他の国（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線上に記載する）

国内特許（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線上に記載する）

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE アラブ首長国連邦 United Arab Emirates | <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> MA モロッコ Morocco |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | <input checked="" type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input checked="" type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴビナ Bosnia and Herzegovina | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> NO ノルウェー Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input checked="" type="checkbox"/> NZ ニュージーランド New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN 中国 China | <input checked="" type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR コスタリカ Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ チェコ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input checked="" type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM ドミニカ Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> SK スロバキア Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input checked="" type="checkbox"/> SL シエラ・レオーネ Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input checked="" type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD グレナダ Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE グルジア Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> TT トリニダッド・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TZ タンザニア United Republic of Tanzania |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | <input checked="" type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN インド India | <input checked="" type="checkbox"/> YU ユーゴースラヴィア Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> ZA 南アフリカ共和国 South Africa |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 日本 Japan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> DZ アルジェリア Democratic People's Republic of Algeria |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> AG アンティグア・バーブーダ Antigua and Barbuda |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | <input checked="" type="checkbox"/> MZ モザンビーク Mozambique |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR リベリア Liberia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LS レソト Lesotho | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania | |

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定（国内特許のために）するためのものである

- DZ アルジェリア Democratic People's Republic of Algeria
 AG アンティグア・バーブーダ Antigua and Barbuda
 MZ モザンビーク Mozambique

確認の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則4. 9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除外される。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。（指定の確認（料金を含む）は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）

追記欄

この追記欄を使用しないときは、この用紙を顔面に含めないこと。

1. 全ての情報を該当する欄の中に記載できないとき。

この場合は、「第何欄....の続き」(欄番号を表示する)と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で情報を記載する。特に、

- (i) 出願人又は発明者として3人以上いる場合で、「続葉」を使用できないとき。
この場合は、「第III欄の続き」と表示し、第III欄で求められている同じ情報を、それぞれの者について記載する。

- (ii) 第II欄又は第III欄の枠の中で、「追記欄に記載した指定国」にレ印を付しいるとき。

この場合は、「第II欄の続き」、「第III欄の続き」又は「第II欄及び第III欄の続き」と記載し、該当する出願人の氏名(名称)を表示し、それぞれの氏名(名称)の次にその者が出願人となる指定国(広域特許の場合)は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許を記載する。

- (iii) 第II欄又は第III欄の枠の中で、発明者又は発明者及び出願人である者が、すべての指定国たため又は米国たための発明者ではないとき。
この場合は、「第II欄の続き」、「第III欄の続き」又は「第II欄及び第III欄の続き」と記載し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国(広域特許の場合)は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許を記載する。

- (iv) 第IV欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第IV欄の続き」と表示し、第IV欄で求められている同じ情報を、それぞれの代理人について記載する。

- (v) 第V欄において指定国又はOAPI特許が、「追加特許」又は「追加証」を伴うとき、又は、米国が「継続」又は「一部継続」を伴うとき。
この場合は、「第V欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国又はOAPI特許を表示し、それぞれの指定国又はOAPI特許の後に、原特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。

- (vi) 第VI欄において優先権を主張する先の出願が4件以上あるとき。

この場合は、「第VI欄の続き」と表示し、第VI欄で求められている同じ情報を、それぞれの先の出願について記載する。

- (vii) 第VI欄において先の出願がARIPOの特許出願であるとき。

この場合は、「第VI欄の続き」と表示し、その先の出願に対応する項目の番号を特定して、更に、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を表示する。

2. 出願人が、第V欄における確認の指定の宣言に関し、その宣言からいずれかの国を除くことを希望するとき。

この場合は、「確認の指定の宣言から、以下の指定国を除く」と記載し、除かれる国名又は2文字の国コードを表示する。

3. 出願人が、指定官庁について不利にならない開示又は新規性の喪失についての例外に関する国内法の適用を請求するとき。

この場合は、「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述」と表示し、以下にその内容を記述する。

「第IV欄の続き」

11045 弁理士 内山 務 UCHIYAMA Tsutomu

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
 17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,
 OSAKA 532-0024 JAPAN

第VI欄 優先権主張

他の優先権の主張(先の出願)が追記欄に記載されている

先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願：国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 10.06.99	平成11年特許願 第163924号	日本国 Japan		
(2)				
(3)				

上記()の番号の先の出願(ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る)のうち、次の()の番号のものについては、出願書類の認証原本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁(日本国特許庁の長官)に対して請求している。

(1)

*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない(規則4.10(b)(ii))。追記欄を参照。

第VII欄 國際調査機関

國際調査機関 (ISA) の選択

ISA/JP

先の調査結果の利用請求；当該調査の照会
(先の調査が、國際調査機関によって既に実施又は請求されている場合)

出願日(日、月、年)

出願番号

国名(又は広域官庁)

第VIII欄 照合欄；出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書	5枚
明細書(配列表を除く)	50枚
請求の範囲	3枚
要約書	1枚
図面	2枚
明細書の配列表	8枚
合計	69枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

1. 手数料計算用紙
2. 別個の記名押印された委任状
3. 包括委任状の写し
4. 記名押印(署名)の説明書
5. 優先権書類(上記第VI欄の()の番号を記載する)
6. 國際出願の翻訳文(翻訳に使用した言語名を記載する)
7. 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
8. ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列表(フレキシブルディスク)
9. その他(書類名を詳細に記載する)
陳述書、フレキシブルディスクの記録面等の情報記載した書面

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名：日本語

第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名(名称)を記載し、その次に押印する。

高橋 秀一



内山 務



1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって

その後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された
国際調査機関

ISA / JP

6. 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に
調査用写しを送付していない

2. 図面

 受理された 不足図面がある

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

様式PCT/RO/101 (最終用紙) (1998年7月:再版2000年1月)

この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない。

P C T

手 数 料 計 算 用 紙
願 書 附 属 書

出願人又は代理人の書類記号

2613WOOP

受理官庁記入欄

国際出願番号

受理官庁の日付印

出願人

武田薬品工業株式会社

所定の手数料の計算

1. 及び2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律(国内法)
第18条第1項第1号の規定による手数料(注1)
(送付手数料[T]及び調査手数料[S]の合計)

90,000 円 T+S

3. 国際手数料(注2)

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 69 枚

最初の30枚まで

46,000 円 b1

39 × 1,100 =
30枚を越える用紙の枚数 用紙1枚の手数料

42,900 円 b2

88,900 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数(注3) 65

8 × 9,900 =

79,200 円 D

支払うべき指定手数料
の数(上限は8)
(注4)

168,100 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

T+S及びIに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

258,100 円

合 計

(注1) 送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

(注2) 国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込を証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

(注3) 願書第V欄で印を付した□の数。

(注4) 指定数を記入する。ただし、8指定以上は一律8とする。

特許協力条約に基づく国際出願
国際予備審査請求書

第Ⅱ章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。

国際予備審査機関記入欄



国際予備審査機関の確認		請求書の受理の日
第Ⅰ欄 国際出願の表示		出願人又は代理人の書類記号 2613WOOP
国際出願番号 PCT/JP00/03720	国際出願日(日、月、年) 08.06.00	優先日(最先のもの)(日、月、年) 10.06.99
発明の名称 新規タンパク質およびそのDNA		
第Ⅱ欄 出願人		
氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 武田薬品工業株式会社 TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. 〒541-0045 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, OSAKA 541-0045 JAPAN		電話番号: ファクシミリ番号: 加入電信番号:
国籍(国名): 日本国 Japan	住所(国名): 日本国 Japan	
氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 木村宏之 KIMURA Hiroyuki 〒590-0975 日本国大阪府堺市大浜中町1丁2番20号808 2-20-808, Ohamanakamachi 1-cho, Sakai-shi OSAKA 590-0975 JAPAN		
国籍(国名): 日本国 Japan	住所(国名): 日本国 Japan	
氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 坂本潤一 SAKAMOTO Junichi 〒565-0085 日本国大阪府豊中市上新田1丁目14番地の30 フレグラン スA103号室 Fureguransu A103, 14-30, Kamishinden 1-chome, Toyonaka-shi, OSAKA 565-0085 JAPAN		
国籍(国名): 日本国 Japan	住所(国名): 日本国 Japan	
<input checked="" type="checkbox"/> その他の出願人が続葉に記載されている。		

国際出願番号

PCT/JP00/03720

.....2.....頁

第Ⅱ欄の続き 出願人

この第Ⅱ欄の続きを使用しない時は、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

澤田秀和 SAWADA Hidekazu
〒572-0806 日本国大阪府寝屋川市大字高宮531番地
531, Oaza-takamiya, Neyagawa-shi, OSAKA 572-0806 JAPAN

国籍（国名）： 日本国 Japan

住所（国名）： 日本国 Japan

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

国籍（国名）：

住所（国名）：

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

国籍（国名）：

住所（国名）：

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

国籍（国名）：

住所（国名）：

その他の出願人が他の続葉に記載されている。

第III欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、 代理人 又は 共通の代表者 として

- 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。
- 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。
- 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）	電話番号：
11404 弁理士 高橋 秀一 TAKAHASHI Shuichi 11045 弁理士 内山 務 UCHIYAMA Tsutomu	03-3278-2235
〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 c/o Osaka Plant of Takeda Chemical Industries, Ltd. 17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi, OSAKA 532-0024 JAPAN	ファクシミリ番号： 03-3278-2222
	加入電信番号：

- 通知のためのあて名：代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

第IV欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述：*

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

- 出願時の国際出願を基礎とすること。
 明細書に関して 出願時のものを基礎とすること。
 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。
 請求の範囲に関して 出願時のものを基礎とすること。
 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正(添付した説明書も含む)を基礎とすること。
 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。
 図面に関して 出願時のものを基礎とすること。
 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。
2 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲に関する補正を差し替えることによって考慮されることを望む。
3 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過まで延期されることを望む。(ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の写しの受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く(規則69. 1(d))。
(この□は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。)

* 記入がない場合は、1)補正がないか又は国際予備審査機関が補正(原本又は写し)を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2)国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正(原本又は写し)を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は 日本語 であり、

- 国際出願提出時の言語である。
 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。
 国際出願の公開の言語である。
 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第V欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国(即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第II章に拘束されている国)を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。-----

第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

国際予備審査機関記入欄

1. 国際出願の翻訳文
2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書
3. 特許協力条約第19条の規定に基づく補正書
(又は、要求された場合は翻訳文) の写し
4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書
(又は、要求された場合は翻訳文) の写し
5. 書簡
6. その他(書類名を具体的に記載する):

枚 枚 枚 枚 枚 枚

受領	未受領
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

1. 手数料計算用紙
2. 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
3. 国際事務局の口座への振込を証明する書面
4. 別個の記名押印された委任状
5. 包括委任状の写し
6. 記名押印(署名)に関する説明書
7. ヌクレオチド又はアミノ酸配列表
(フレキシブルディスク)
8. その他(書類名を具体的に記載する):

第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名(名称)記載し、その次に押印する。

高橋 秀一



内山 務



国際予備審査機関記入欄

1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。 出願人に通知した。

4. 規則80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理

5. 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:

振込みを証明する書面

お手続日		預金払戻請求書 預金口座振替による振込手数料受取書		振込金受取書 (兼振込手数料受取書)		方法	支店名	住友本支店宛	他電	行信	宛扱							
お振込先	10年9月8日	アリガタ	トウキヨウ	アリガタ	トウキヨウ	アリガタ	トウキヨウ	アリガタ	トウキヨウ	アリガタ	トウキヨウ							
		日本語で記入ください。	日本語で記入ください。	日本語で記入ください。	日本語で記入ください。	日本語で記入ください。	日本語で記入ください。	日本語で記入ください。	日本語で記入ください。	日本語で記入ください。	日本語で記入ください。							
お振込人	東京三菱銀行		内幸町		支店		預金種目		9	1.普通 4.貯蓄								
お振込人	アリガナ ワイボーピーシーティー、シュネーブ WIPO-PCT, Geneva様		金額		古儀	拾億	億	千万	百万	十万	万	千	百	拾	日			
お名前	アリガナ タケダヤクヒンコウギョウカブシキガイシャ 武田薬品工業株式会社		様		内幸町	支店	預	古儀	拾億	億	千万	百万	十万	万	千	百	拾	日
預 入 金 額 入 金 額							(支店の営業のみ記入する)											
<p>お振込金額に記載直前等の準備があった場合には、該当等のために振り込みが遅延することがあります。 の遅延振込、回送の遅延または郵便物の遅延等やむを除く事由によって 振り込みが遅延することもありますのでご了承ください。</p> <p>このたびは住友銀行をご利用いただきまして、誠にありがとうございました。 今後とも引き続きお引き立て賜りますよう、お願い申し上げます。 お振り込みは早くて便利な自動サービス機をご利用ください。 均金でのお振り込みは、平日午後6時までお取り扱いいたします。 キャッシュカードでのお振り込みは、平日午後10時以降、土・日曜日、祝日も お取り扱いいたします。(一部店舗を除く)</p>																		
<p>株式会社 住友銀行</p> <p>印鑑欄</p> <p>10年9月8日</p>																		

取扱手数料

14,600円

THIS IS A PAGE IN BLANK
(SHE TO)

第Ⅱ章

P C T

手数料計算用紙

国際予備審査請求書の附属書

国際予備審査機関記入欄

国際出願番号

PCT/JP00/03720

出願人又は代理人の書類記号

2613WOOP

国際予備審査機関の日付印

出願人

武田薬品工業株式会社

所定の手数料の計算

1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律(国内法)
第18条第1項第4号の規定による手数料
(予備審査請求料) (注1)

28,000 円

P

2. 取扱手数料 (注2).....

14,600 円

H

3. 所定の手数料の合計

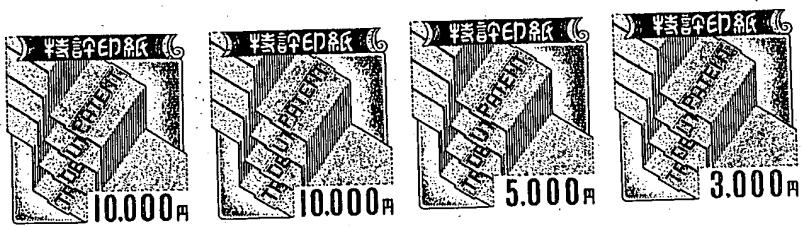
P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入…

42,600 円

合 計

(注1) 法第18条第1項第4号の規定による手数料については、特許印紙をもって納付しなければならない。

(注2) 取扱手数料については、国際予備審査機関である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振り込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。



予備審査請求料

28,000 円

担当者	G・M		Pat・M	部長
特許協力条約	審査			

15

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

P C T

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)
〔PCT規則71.1〕

受付

'01.3.26

知的財産部

発送日
(日.月.年) 21.03.01

重要な通知

出願人又は代理人
の書類記号

2613WOOP

国際出願番号

PCT/JP00/03720

国際出願日

(日.月.年) 08.06.00

優先日

(日.月.年) 10.06.99

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。
4. 注意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から3ヶ月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名
日本国特許庁（IPEA/JP）
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員
特許庁長官

4B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

注 意

1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

[申込方法]

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

- 特許・実用新案及び意匠の種類
- 出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）
- 必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

- 国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

[申込み及び照会先]

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル
財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-3503-3900

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される。

原寄託についての受託証

氏名（名称） 武田薬品工業株式会社
代表者 武田 國男

寄託者

あて名

殿

大阪市中央区道修町四丁目1番1号

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

Escherichia coli DH5α/pMCMV-hGAT2

(受託番号)

FERM BP- 6739

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成11年6月2日（原寄託日）に受領した1欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に1欄の微生物を受領した。
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称： National Institute of Bioscience and Human-Technology
 Agency of Industrial Science and Technology

所長 大篠 信

Dr. Shinji Ochiai Director-General

あて名： 日本国茨城県つくば市東山1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken

305-8566, JAPAN

平成11年(1999) 6月 2日

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Chemical Industries, Ltd.
Kunio TAKEDA
representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, OSAKA 541 JAPAN

1. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR: Escherichia coli DH5 α 21/ pMCMV-hGAT2 Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: FERM BP-6739

2. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

- a scientific description
 - a proposed taxonomic designation

3. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on June 2, 1999 (date of the original deposit).

4. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depository Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - .

5. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

Ph. D., DIRECTOR GENERAL
Shinichi Ohashi

Date: June 2, 1999

Address: 1-3, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

担当者 G・M Pat・M 部長
特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

あて名

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

PCT/JP00/03720

SA202

P C T

調査用写しの受理通知書

(法施行規則第39条)
(PCT規則25.1)



発送日（日、月、年）
04.07.00

出願人又は代理人 の書類記号	2613WOOP	重 要 な 通 知
国際出願番号 PCT/JP00/03720	国際出願日（日、月、年） 08.06.00	優先日（日、月、年） 10.06.99
出願人（氏名又は名称） 武田薬品工業株式会社		

1. 国際調査機関と受理官庁が同一の機関でない場合、

国際出願の調査用写しを国際調査機関が下記の日に受理したので通知する。

国際調査機関と受理官庁が同一の機関である場合、

国際出願の調査用写しを下記の日に受理したので通知する。

04日07月00年（受理の日）

2. 調査用写しには、コンピューター読み取りが可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が添付されている。

3. 国際調査報告の作成期間

国際調査報告の作成期間は、上記受理の日から3箇月の期間又は優先日から9箇月の期間のいずれか遅く満了する期間である。

4. この通知書の写しは、国際事務局及び上記1の第1文が適用される場合には受理官庁に送付した。

名称及びあて名 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308 日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 様式 PCT/ISA/202 (1998年7月)	権限のある職員 特許庁長官
--	------------------

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2613WOOP	FOR FURTHER ACTION		See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/03720	International filing date (day/month/year) 08/06/2000	Priority date (day/month/year) 10/06/1999	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC Int.C1 ⁷ C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, A61P25/28, A61P25/00, G01N33/50			
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD			

<p>1. This international preliminary examining report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEAXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of sheets.</p>																								
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <table> <tr> <td>I</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Basis of the report</td> </tr> <tr> <td>II</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Priority</td> </tr> <tr> <td>III</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td> </tr> <tr> <td>IV</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Lack of unity of invention</td> </tr> <tr> <td>V</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td> </tr> <tr> <td>VI</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Certain documents cited</td> </tr> <tr> <td>VII</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Certain defects in the international application</td> </tr> <tr> <td>VIII</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Certain observations on the international application</td> </tr> </table>	I	<input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report	II	<input type="checkbox"/>	Priority	III	<input type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	IV	<input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention	V	<input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	VI	<input type="checkbox"/>	Certain documents cited	VII	<input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application	VIII	<input checked="" type="checkbox"/>	Certain observations on the international application
I	<input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report																						
II	<input type="checkbox"/>	Priority																						
III	<input type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability																						
IV	<input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention																						
V	<input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement																						
VI	<input type="checkbox"/>	Certain documents cited																						
VII	<input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application																						
VIII	<input checked="" type="checkbox"/>	Certain observations on the international application																						

Date of submission of the demand 14/09/2000	Date of completion of this report 07/03/2001
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: Japanese Patent Office (IPEA/JP) 4-3, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, TOKYO 100-8915 JAPAN	Authorized officer ROKUKASA Noriko Telephon No. 03 3581 1101 3448

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application N . PCT/JP00/03720

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).):

International Filing Document as originally filed

Description, pages:

- as originally filed
 as received on with letter of

Claims, No:

- as originally filed
 as received on with letter of

Drawings No:

- as originally filed
 as received on with letter of

Sequence Listing

- as originally filed
 as received on with letter of

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
 the language of publication of the international application (under Rule 48.3 (b)).
 the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- contained in the international application in written form.
 filed together with the international application in computer readable form.
 furnished subsequently to this Authority in written form.
 furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
 The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
 The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- the description, pages:
 the claims, Nos.:
 the drawings, sheets:

5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2c):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/JP00/03720

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: <u>Claims</u>	<u>1-19</u>
	No: <u>Claims</u>	
Inventive Step (IS)	Yes: <u>Claims</u>	
	No: <u>Claims</u>	<u>1-19</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: <u>Claims</u>	<u>1-19</u>
	No: <u>Claims</u>	

2. References and Comments thereon

Reference 1: Liu, Q-R. et al.

"Molecular characterization of four pharmacologically distinct alpha-aminobutyric acid transporters in mouse brain"
The Journal of Biological Chemistry (1993) Vol. 268 No.3 P.2106-2112

Reference 2: Borden, L.A. et al.

"Molecular heterogeneity of the gamma-aminobutyric acid (GABA) transport system"
The Journal of Biological Chemistry (1992) Vol.267 No.29 P.21098-21104

Regarding Claims 1 to 19:

Reference 1 describes amino acids sequences and DNA sequences of mouse-derived gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter GAT3, GAT4 (Reference 1, page 2108, FIG.1 and FIG.3), and alignments of amino acids sequences of GAT1, 2, 3 and 4 (Reference 1, page 2110, FIG.4).

Reference 2 describes amino acid sequences of rat brain-derived GABA transporter GAT2 and 3 (Reference 2, page 21101, FIG.2).

Since it is frequent that a certain nucleic acid sequence is kept in evolution from a species to species to extent that the nucleic acid sequences are hybridizable, it would be obvious for a skilled person to obtain a GABA transporter gene, in human which is a different species, based on the amino acid sequences described in References 1 and 2.

Further, once a certain gene is obtained, it would be obvious for a skilled person to do the following: preparation of a protein by transferring the gene into a suitable vector to transfet a host; preparation of an antibody to the protein; screening of a compound which may activate or inhibit a GABA transporter activity, using the protein prepared. Therefore, the inventions set forth in Claims 1 to 19 could have been easily made based on descriptions of References 1 and 2.

In general, when only desired properties are specified, it is difficult to recognize compounds per se, having such properties. A specification which does not describe any hints to obtain an active ingredient necessary for practicing the invention, requires try-and-errors exceeding a reasonable expectation of a skilled person, i.e., requiring preparation of a large number of compounds and screening thereof to confirm the presence of said properties. Thus, it is considered that such specification is not clearly and sufficiently described to extent that a skilled person can practice the invention.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/JP00/03720

Re Item VIII Opinion for International Patent Application

When considering the present specification, although it describes a screening method to identify a compound which activates or inhibits a GABA transporter activity, specific compounds are not described, which are obtained by the screening method. Further, the specification does not describe any hints to obtain an active ingredient such as chemical structures, and it is not considered that such hints or the like could have been recognized at the time of filing. Thus, the active ingredients set forth in the claims cannot be recognized by a skilled person, resulting in try-and-errors exceeding a reasonable expectation of a skilled person, i.e., requiring preparation of a large number of compounds and screening thereof in the practice of the invention.

Accordingly, the detailed descriptions of the invention are not clearly and sufficiently described to extent that a skilled person can practice the invention.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION (PCT Rule 61.2)

Date of mailing:

21 December 2000 (21.12.00)

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

International application No.:

PCT/JP00/03720

Applicant's or agent's file reference:

2613WOOP

International filing date:

08 June 2000 (08.06.00)

Priority date:

10 June 1999 (10.06.99)

Applicant:

KIMURA, Hiroyuki et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

14 September 2000 (14.09.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra
Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

127
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2613WO0P	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/03720	International filing date (day/month/year) 08 June 2000 (08.06.00)	Priority date (day/month/year) 10 June 1999 (10.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/47, C12N 15/12, C07K 16/18, A61P 25/28, 25/00, G01N 33/50		
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 14 September 2000 (14.09.00)	Date of completion of this report 07 March 2001 (07.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____ the claims:pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____ the drawings:pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____ the sequence listing part of the description:pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is: the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____
 the claims, Nos. _____
 the drawings, sheets/fig. _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

PCT/JP00/03720

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: "Molecular characterization of four pharmacologically distinct α -aminobutyric acid transporters in mouse brain", (Liu, Q.R. et al.), The Journal of Biological Chemistry (1993), Vol. 268, No. 3, pages 2106-2112

Document 2: "Molecular heterogeneity of the γ -aminobutyric acid (GABA) transport system," (Borden, L.A. et al.), The Journal of Biological Chemistry (1992), Vol. 267, No. 29, pages 21098-21104

Claims 1-19

Document 1 describes the amino acid sequences and gene arrangements of γ -aminobutyric acid (GABA) transporters GAT3 and GAT4 derived from the mouse brain (page 2108, Figs. 1 and 3) and the alignments of amino acid sequences of GAT1, 2, 3 and 4 (page 2110, Fig. 4).

Document 2 describes the amino acid sequences of GABA transporters GAT 2 and 3 derived from the rat brain (page 21101, Fig. 2).

Since the sequence of a nucleic acid encoding a protein is often preserved in evolution to such an extent as to allow interspecific nucleic acid hybridization, a person skilled in the art could have easily conceived of acquiring corresponding GABA transporter genes in the human, i.e., another animal species, based on the amino acid sequences described in documents 1 and 2.

In the case where a gene is acquired, a person skilled in the art could have (1) integrated it into an adequate vector, for transporting the host, to produce a protein, (2) produced an antibody against the protein, and (3) promoted the GABA transporter activity or screened inhibitory compounds using the produced protein, by use of well-known techniques.

So, a person skilled in the art could have easily achieved the subject matters of claims 1-19 based on the descriptions of documents 1 and 2.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03720

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Generally since it is difficult to identify a compound per se having a desired nature only by specifying the nature, a specification that does not describe guidelines such as a chemical structure for acquiring an effective component requires trial and error beyond that expected for a person skilled in the art, in producing and screening innumerable compounds for confirming whether or not they have the nature, in order to acquire the effective component necessary for carrying out the invention. So, it is judged that the specification does not contain sufficiently clear or detailed descriptions to allow a person skilled in the art to carry out the invention.

In view of the above, the specification of the present application describes a screening method for identifying a compound that promotes or inhibits the GABA transporter activity, but does not describe particular examples of the compound obtained by this method. Furthermore, it does not describe guidelines such as a chemical structure for acquiring an effective component; and it is considered that a person skilled in the art could not have estimated it when the present application was filed. So, a person skilled in the art cannot understand the effective component included in the claims. Therefore, when this invention is carried out, trial and error beyond that expected for a person skilled in the art in producing and screening innumerable compounds for confirmation are necessary.

Thus, "Detailed description of the invention" does not clearly or sufficiently describe the subject matters of claims 14-19 such that a person skilled in the art can carry out the invention.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Borden, L. A. et al. "Cloning and expression of a betaine/GABA transporter from human brain" Journal of Neurochemistry (1995) Vol. 64 No. 3 P. 977-984	1-19
X	Rasola, A. et al. "Molecular cloning and functional characterization of a GABA/betaine transporter from human kidney" FEBS Letters (1995) Vol. 373 No. 3 P. 229-233	1-19
X	WO, 96/04790, A1 (Synaptic Pharmaceutical Corporation) 22.2月.1996 (22.02.96) & AU, 9533684, A & US, 5766848, A	1-19
X	US, 5658786, A (Synaptic Pharmaceutical Corporation) 19.8月.1997 (19.08.97) & WO, 93/18143, A1 & AU, 9337893, A & EP, 631623, A1 & JP, 7-507446, W & AU, 691469, B & AU, 9880906, A & AU, 707934, B	1-19
X	US, 5712148, A (Synaptic Pharmaceutical Corporation) 27.1月.1998 (27.01.98) & WO, 94/15618, A1 & AU, 9460827, A & EP, 678028, A1	1-19
P, X	Bolvig, T. et al. "Action of bicyclic isoxazole GABA analogues on GABA transporters and its relation to anticonvulsant activity" European Journal of Pharmacology (30. June, 1999) Vol. 375 No. 1-3 P. 367-374	1-19

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, A61P25/28, A61P25/00
G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, A61P25/28, A61P25/00
G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Liu, Q-R. et al. "Molecular characterization of four pharmacologically distinct α -aminobutyric acid transporters in mouse brain" The Journal of Biologocal Chemistry (1993) Vol. 268 No. 3 P. 2106-2112	1-19
X	Borden, L. A. et al. "Molecular heterogeneity of the γ -aminobutyric acid (GABA) transport system" The Journal of Biologocal Chemistry (1992) Vol. 267 No. 29 P. 21098-21104	1-19

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.09.00

国際調査報告の発送日

26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

六笠 紀子

印 4B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

特許協力条約

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 2613WOOP	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPOO/03720	国際出願日 (日.月.年) 08.06.00	優先日 (日.月.年) 10.06.99
出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表

この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

特許協力条約

PCT

国際予備審査報告

REC'D 26 MAR 2001

WIPO PCT

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 2613WOOP	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/03720	国際出願日 (日.月.年) 08.06.00	優先日 (日.月.年) 10.06.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl' C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, A61P25/28, A61P25/00, G01N33/50		
出願人（氏名又は名称） 武田薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70, 16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I 国際予備審査報告の基礎
- II 優先権
- III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV 発明の単一性の欠如
- V PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ある種の引用文献
- VII 国際出願の不備
- VIII 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 14.09.00	国際予備審査報告を作成した日 07.03.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 六笠 紀子 印
	4B 9735
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲	1-19	有
請求の範囲		無

進歩性 (I S)

請求の範囲		有
請求の範囲	1-19	無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲	1-19	有
請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

引用文献1 : Liu, Q-R. et al.

"Molecular characterization of four pharmacologically distinct α -aminobutyric acid transporters in mouse brain"
The Journal of Biological Chemistry (1993) Vol. 268 No. 3 P. 2106-2112

引用文献2 : Borden, L. A. et al.

"Molecular heterogeneity of the γ -aminobutyric acid (GABA) transport system"
The Journal of Biological Chemistry (1992) Vol. 267 No. 29 P. 21098-21104

請求の範囲 1-19について

引用文献1には、マウス脳由来の γ -aminobutyric acid (GABA) トランスポーター GAT 3、GAT 4 のアミノ酸配列及び遺伝子配列が記載され（引用文献1 第 2108 頁 FIG. 1, FIG. 3）、GAT 1、2、3 及び 4 のアミノ酸配列のアライメントが記載されている（引用文献1 第 2110 頁 FIG. 4）。

引用文献2には、ラット脳由来の GABA トランスポーター GAT 2 及び 3 のアミノ酸配列が記載されている（引用文献2 第 21101 頁 FIG. 2）。

ここで、ある蛋白質をコードする核酸の配列は種間の核酸ハイブリダイゼーションが可能な程度に進化において保存されていることが多いので、引用文献1 や 2 に記載されたアミノ酸配列をもとに、他の動物種であるヒトにおいて対応する GABA トランスポーター 遺伝子を取得しようとするることは当業者が容易に想到し得たものと認められる。

また、遺伝子が取得された場合に、適当なベクターに組み込み宿主を形質転換して蛋白質を製造すること、蛋白質に対する抗体を作製すること、製造された蛋白質を用いて GABA トランスポーター活性の促進または阻害化合物をスクリーニングすることは当業者が周知の技術を用いてなし得たことである。

従って、請求の範囲 1 乃至 19 に係る発明は引用文献1 や 2 の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

VIII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

一般に、所望の性質を特定することのみで、その性質を有する化合物 자체を把握することは困難であるため、化学構造等の有効成分を得るための手がかりが記載されない明細書は、発明の実施に必要な有効成分の入手過程において、無数の化合物を製造、スクリーニングして、当該性質を有するか否かを確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を求めるものであり、当業者が発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されていないものと判断される。

これを本願明細書についてみると、GABAトランスポーター活性を促進あるいは阻害する化合物を識別するためのスクリーニング方法は記載されているものの、該方法により得られた化合物の具体例が記載されておらず、また、有効成分を得るために化学構造等の手がかりが記載されておらず、かつ、それが出願時に当業者に推認できたものとも認められないで、請求項に包含される有効成分を当業者が理解できず、発明の実施にあたり、無数の化合物を製造、スクリーニングして確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を求めるものである。

したがって、発明の詳細な説明は、請求の範囲14乃至19係る発明を当業者が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

- | | | |
|---|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ | 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 _____ ページ
- 請求の範囲 第 _____ 項
- 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

PCT見解書

(法第13条)
[PCT規則66]

受付

'00.12.14

知的財産部

発送日
(日.月.年)

01.2.12

12.12.00

出願人又は代理人 の書類記号	2613WOOP	応答期間	上記発送日から 2 月以内
国際出願番号 PCT/JP00/03720	国際出願日 (日.月.年) 08.06.00	優先日 (日.月.年) 10.06.99	
国際特許分類 (IPC) Int.Cl' C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, A61P25/28, A61P25/00, G01N33/50			
出願人 (氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社			

- これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。
- この見解書は、次の内容を含む。
 - I 見解の基礎
 - II 優先権
 - III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
 - IV 発明の單一性の欠如
 - V 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - VI ある種の引用文献
 - VII 国際出願の不備
 - VIII 国際出願に対する意見
- 出願人は、この見解書に応答することが求められる。

いつ？ 上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。

どのように？ 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。
- 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 10.10.01 である。

名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 六笠 紀子	4B	9735
電話番号 03-3581-1101 内線 3448			

I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するため提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/>	明細書 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの 付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書 第 _____	ページ、	
<input type="checkbox"/>	明細書 第 _____	ページ、	
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第 _____	項、	出願時に提出されたもの PCT19条の規定に基づき補正されたもの 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの 付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第 _____	項、	
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第 _____	項、	
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第 _____	項、	
<input type="checkbox"/>	図面 第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの 付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	図面 第 _____	ページ/図、	
<input type="checkbox"/>	図面 第 _____	ページ/図、	
<input type="checkbox"/>	明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの 付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	
<input type="checkbox"/>	明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 _____ ページ
- 請求の範囲 第 _____ 項
- 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2000年12月21日 (21.12.2000)

PCT

(10)国際公開番号
WO 00/77045 A1

(51)国際特許分類: C07K 14/47, C12N 15/12, C07K 16/18, A61P 25/28, 25/00, G01N 33/50

LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP00/03720

(72)発明者; および

(22)国際出願日: 2000年6月8日 (08.06.2000)

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 木村宏之 (KIMURA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒590-0975 大阪府堺市大浜中町1丁2番20号 808 Osaka (JP). 坂本潤一 (SAKAMOTO, Junichi) [JP/JP]; 〒565-0085 大阪府豊中市上新田1丁目14番地の30 フレグランスA103号室 Osaka (JP). 澤田秀和 (SAWADA, Hidekazu) [JP/JP]; 〒572-0806 大阪府寝屋川市大字高宮531番地 Osaka (JP).

(25)国際出願の言語: 日本語

(74)代理人: 弁理士 高橋秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願平11/163924 1999年6月10日 (10.06.1999) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,

/統葉有/

(54) Title: NOVEL PROTEIN AND DNA THEREOF

(54)発明の名称: 新規タンパク質およびそのDNA

(57) Abstract: A novel protein and use thereof. This protein or salts thereof, peptide fragments or amides, esters or salts thereof, and DNAs encoding the same are usable as reagents in acquiring an antibody and an antiserum, constructing an expression system of the above protein, constructing a system for assaying GABA transporter activity and screening candidate compounds for drugs by using the above expression system or designing drugs on the basis of the stereostructure of GABA transporter, or as drugs in constructing transgenic animals, gene preventives/remedies or the like.

(57)要約:

本発明は、新規タンパク質およびその用途の提供。

本発明のタンパク質またはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、およびそれらをコードするDNAは、抗体および抗血清の入手、本発明のタンパク質の発現系の構築、同発現系を用いたGABAトランスポーターの活性を測定する系の構築と医薬品候補化合物のスクリーニング、GABAトランスポーターの立体構造にもとづいたドラッグデザインの実施、遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーを作成するための試薬、トランスジェニック動物の作製または遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして用いることができる。

WO 00/77045 A1

LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

添付公開類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

新規タンパク質およびそのDNA

技術分野

5 本発明は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（好ましくは、GABAトランスポーター活性を有するタンパク質：以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）またはその塩およびそれをコードするDNAなどに関する。

10 背景技術

抑制性神経伝達物質である γ -アミノ酪酸（GABA）は、GABA作動性神経から遊離された後、神経終末およびグリア細胞にあるGABAトランスポーターの働きにより細胞外液中から取り除かれる。このGABAトランスポーターによる能動的な取り込み機構が神経伝達終了を決定する最も重要な機構である。

15 GABAトランスポーターには、4種類のサブタイプ（GAT-1、GAT-2、GAT-3、BGT-1）の存在が知られ、GAT-1とGAT-3は脳、網膜に、GAT-2はほとんどすべての臓器に、BGT-1は腎臓、脳に分布している。GAT-1遺伝子はマウス（Gene Bank accession No. M92378）、ラット（Gene Bank accession No. M33003）、ヒト（Gene Bank accession No. X54673）から、GAT-2遺伝子はマウス（Gene Bank accession No. L04663）、
20 ラット（Gene Bank accession No. M95762）から、GAT-3遺伝子はマウス（Gene Bank accession No. L04662）、ラット（Gene Bank accession No. M95763）から、BGT-1遺伝子はマウス（Gene Bank accession No. M97632）、イヌ（Gene Bank accession No. M80403）からそれぞれクローニングされているが、ヒトGAT-2遺伝子は、これまで知られていない。

25 本発明は、(i)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（好ましくは、GABAトランスポータ

一活性を有するタンパク質)、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル、またはそれらの塩、(ii)該配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質(好ましくは、GABAトランスポーター活性を有するタンパク質)またはその部分ペプチドをコードするDNA、(iii)該DNAを含有する組換えベクター、(iv)該組換えベクターを保持する形質転換体、(v)該配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質(好ましくは、GABAトランスポーター活性を有するタンパク質)またはその塩の製造法、(vi)該配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質(好ましくは、GABAトランスポーター活性を有するタンパク質)、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩に対する抗体、(vii)該配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質(好ましくは、GABAトランスポーター活性を有するタンパク質)のGABAトランスポーター活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、(viii)該スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩、および(ix)該化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供することを目的とする。

発明の開示

20 本発明者らは、銳意研究を重ねた結果、マウスやラットのGAT-2と高い相同性を有するヒト由来のGABAトランスポータータンパク質をコードするcDNAを単離し、全塩基配列を解析した後、細胞で発現させることに成功した。そして、本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

25 すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の

アミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(2) GABAトランスポーター活性を有する上記(1)記載のタンパク質またはその塩、

(3) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドもしくはそのアミドもしく
5 はそのエステルまたはその塩、

(4) 上記(1)記載のタンパク質または上記(3)記載の部分ペプチドをコ
ードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(5) 配列番号：2で表わされる塩基配列を有する上記(4)記載のDNA、

(6) 上記(4)記載のDNAを含有する組換えベクター、

10 (7) 上記(6)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(8) 上記(7)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のタンパク質ま
たは上記(3)記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取すること
を特徴とする上記(1)記載のタンパク質またはその塩、または上記(3)記
載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製
造法、

15 (9) 上記(1)記載のタンパク質もしくはその塩、または上記(3)記載の
部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する
抗体、

(10) 上記(1)記載のタンパク質またはその塩、または上記(3)記載の
部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いて
GABAトランスポーター活性を測定することを特徴とするGABAトランスポーター
活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(11) 上記(1)記載のタンパク質またはその塩、または上記(3)記載の
部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いる
ことを特徴とする上記(1)記載のタンパク質またはその塩、または上記(3)
25 記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩

のGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(12) 上記(1)記載のタンパク質またはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなるGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(13) 上記(1)記載のタンパク質またはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる上記(1)記載のタンパク質またはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩のGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(14) 上記(10)記載のスクリーニング方法または上記(12)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、GABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

(15) 上記(11)記載のスクリーニング方法または上記(13)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質またはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩のGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

(16) 上記(10)記載のスクリーニング方法または上記(12)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、GABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(17) 上記(11)記載のスクリーニング方法または上記(13)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質またはその塩、または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそ

のエステルまたはその塩のGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(18) 不安症、痙攣、てんかん、精神分裂病、脳血管障害、脳性麻痺、痙性脊髄麻痺、変形性脊椎症、脊髄小脳変性症、多発性硬化症に伴う痙性麻痺、緊

5 張型頭痛、腰痛症、頸肩腕症候群の予防・治療剤である、上記(1)記載のタンパク質またはその塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩のGABAトランスポーター活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、および

(19) 痴呆症の予防・治療剤である、上記(1)記載のタンパク質またはそ

10 の塩、上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩のGABAトランスポーター活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる医薬などに関する。

より具体的には、

(20) タンパク質が、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列、配列番号

15 : 1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が付加し

20 たアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質である上記(1)記載のタンパク質またはその塩、

25 (21) 上記(1)記載のタンパク質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルもしくはその塩と試験

- 化合物とを接触させた場合とさせなかつた場合との比較を行なうことを特徴とする上記（10）または（11）記載のスクリーニング方法、
- （22）上記（1）記載のタンパク質を含有する細胞に試験化合物を接触させた場合とさせなかつた場合との比較を行なうことを特徴とするGABAトランスポーター活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870

図面の簡単な説明

図1は実施例で得られた、本発明のヒト由来タンパク質のアミノ酸配列をもとに作成した、疎水性プロットを示す。

図2は本発明のタンパク質を発現させたhGAT2/LM(TK⁻)細胞にナトリウムイオンと塩素イオンを含むバッファー中に[³H]-GABAを添加した後、取り込まれたラベル体の増加量を測定した結果を示す。左側のグラフはhGAT2/LM(TK⁻)は、本発明のヒト由来タンパク質を発現させたLM(TK⁻)細胞を示し、右側のグラフはMock/LM(TK⁻)は、プラスミドpMCMVneoを導入したLM(TK⁻)細胞を示す。左側の数字は、hGAT2/LM(TK⁻)細胞にナトリウムイオンと塩素イオンを含むバッファー中に50nM [³H]-GABAを添加した後、ラベル体の取り込み量を測定した結果を示す。データは平均値±標準誤差として表した。

発明を実施するための最良の形態

本発明のタンパク質は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質である。

本発明のタンパク質は、例えば、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、臍臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、纖維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁頭核、大脑基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脑皮質、延髓、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殼、尾状核、脳染、黒質）、

脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来するタンパク質であってもよく、
5 また合成タンパク質であってもよい。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約95%以上、好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

「実質的に同一」とはタンパク質の活性、例えば、輸送体活性（GABAトランスポーター活性）、生理的な特性などが、実質的に同じことを意味する。アミノ酸の置換、欠失、付加あるいは挿入はしばしばポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさないが、こうした場合その置換、欠失、付加あるいは挿入を施されたタンパク質は、こうした置換、欠失、付加あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であるとされるであろう。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができる。非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられる。極性（中性）アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられる。陽電荷をもつ（20 塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸な

どがあげられる。

また、実質的に同質とは、それらの活性が性質的に（生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、その活性が同等であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

輸送体活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明のタンパク質としては、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。さらに、本発明のタンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したG1nがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のタンパク質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のタンパク質のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。

5 具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質の部分ペプチドとしては、[図1]で示される疎水性プロット解析において、細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを別個に含むペプチドも用い得るが、複数の
10 ドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加し、または、
15 そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）
20 またはカルボキシレート（-COO⁻）であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）（Rは上記と同意義を示す）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原として用いることができるの

で、必ずしもGABAトランスポーター活性を有する必要はない。

本発明のタンパク質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、

5 酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、亜酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のタンパク質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、
20 固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。
25 ① M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榎原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、

5 (1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、GABAトランスポーター活性など）を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのもの

でもよい。

配列番号：2で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライプラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約1.9～4.0 mM、好ましくは約1.9～2.0 mMで、温度が約50～70°C、好ましくは約60～65°Cの条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約1.9 mMで温度が約6.5°Cの場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライプラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライプラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライプラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する

) によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、

配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または②配列番号：2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな
5 条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、GABAトランスポーター活性など）を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、

例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約95%以上、好ましくは約9
10 8%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。ハイ
ブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様の
ものが用いられる。

本発明のタンパク質またはその部分ペプチド（以下、本発明のタンパク質と略記する）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、（1）
15 本発明のタンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または（2）適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別すること、などが挙げられる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換（欠失・付加・置換）は、公知のキット、例えば、
25 MutanTM-G（宝酒造（株））、MutanTM-K（宝酒造（株））などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従つ

て行なうことができる。

クローン化された本発明のタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのA 5 TGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適當な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適當な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、パキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場

合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上その他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp'を略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1〔プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・

オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレオイック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA 221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジエネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20 B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盜蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来のMG-1細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来のHigh FiveTM 細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャ

— (Nature) , 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO(dhfr-)細胞と略記), マウスL細胞, マウスA_tT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞, HEK293細胞、C127細胞、BALB3T3細胞、Sp-2細胞などが用いられる。これらの中でも、CHO細胞、CHO(dhfr-)細胞、HEK293細胞、LM細胞などが好ましい。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン(Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス(Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー(Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

25 発現ベクターの動物細胞への導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法[Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー(Virology) 52, 456-467

(1973)]、電気穿孔法 [Nuemann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.) 1, 841-845 (1982)] 等が挙げられる。

このようにして、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

5 なお、動物細胞を用いて、本発明のタンパク質を安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローン選択を行なうことにより本

10 発明のタンパク質の高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができる。

また、dhfr遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、dhfr遺伝子とともに、本発明のタンパク質をコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

15 上記の形質転換体を本発明のタンパク質をコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明のタンパク質を生成、蓄積せしめることによって、本発明のタンパク質またはその塩を製造することができる。

宿主がエシエリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母抽出液、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 3β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43°Cで約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40°Cで約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーニ

エスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は

通常約20°C~35°Cで約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27°Cで約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5～20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM 培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640 培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199 培地 [プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pH は約 6～8 であるのが好ましい。培養は通常約 30℃～40℃ で約 15～72 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体に本発明のタンパク質を発現させることができる。

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により本発明のタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトン X-100TM などの界面活性剤が含まれていてもよい。

このようにして得られた抽出液中に含まれる本発明のタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィー

などの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明のタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明のタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のタンパク質と略記する）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

[モノクローナル抗体の作製]

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行

なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物
5 、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後
に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または
異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイ
ブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後
記の標識化した本発明のタンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合
10 した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知
の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、25
6巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤と
しては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどが
が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

15 骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-a
などの温血動物の骨髄腫細胞などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。
用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比
率は1：1～20：1程度であり、PEG(好ましくは、PEG1000～P
EG6000)が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ま
20 しくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よ
く細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が
使用できるが、例えば、本発明のタンパク質抗原を直接あるいは担体とともに
吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し
25 、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用
いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)ま

たはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明のタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

- 5 モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

- モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

- 25 本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（本発明のタンパク質抗

原) 自体、あるいはそれとキャリアータンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造できる。

5 哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に関し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシア
10 ニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる
15 。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことが
20 できる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうこと
25 ができる。

本発明のタンパク質、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩、およびそれらをコードするDNAは、抗体および抗血清の入手、本発明のタンパク質の発現系の構築、同発現系を用いたGABAトランスポーターの活性を測定する系の構築と医薬品候補化合物のスクリーニング
5 、GABAトランスポーターの立体構造にもとづいたドラッグデザインの実施、遺伝子診断におけるプローブやP.C.Rプライマーを作成するための試薬、トランジジェニック動物の作製または遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして用いることができる。

特に、本発明のタンパク質の発現系を用いたGABAトランスポーター活性測定系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なGABAトランスポーター活性を変化させる化合物をスクリーニングすることができ、該化合物を各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のタンパク質、部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質を発現する細胞および本発明のタンパク質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途について、以下に具体的に説明する。

（1）本発明のタンパク質の活性を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明のタンパク質を用いるか、または本発明のタンパク質の発現系を構築し、該発現系を用いたGABAトランスポーター活性測定系を用いることによって、本発明のタンパク質のGABAトランスポーター活性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、本発明のタンパク質のGABAトランスポーター活性を増強する化合物、あるいは本発明のタンパク質のGABAトランスポーター活性を

阻害させる化合物などが含まれる。

すなわち、本発明は、本発明のタンパク質に試験化合物を接触させた場合とさせなかつた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のタンパク質の機能（具体的には、GABAトランスポーター活性）を変化させる化合物またはその

5 塩のスクリーニング方法を提供する。

より具体的には、本発明は、

本発明のタンパク質と試験化合物とを接触させた場合とさせなかつた場合との比較を行なうことを特徴とするスクリーニング方法、

本発明のタンパク質を含有する細胞に試験化合物を接触させた場合とさせなかつた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のタンパク質の機能（具体的には、GABAトランスポーター活性）を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した本発明のタンパク質に試験化合物を接触させた場合とさせなかつた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のタンパク質の機能（具体的には、GABAトランスポーター活性）を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のタンパク質が得られる以前は、例えば、GABAトランスポーター活性を変化させる化合物をスクリーニングする場合、まずラットなどのGABAトランスポータータンパク質を含む細胞、組織を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後に該候補化合物が実際にヒトのGABAトランスポーターの活性を変化させる化合物であるか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織をそのまま用いれば他の輸送体タンパク質も混在するために、目的とするGABAトランスポータータンパク質の活性を変化させる化合物を実際にスクリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来タンパク質を発現する細胞を用い

ることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、GABAトランスポーター活性を変化させる化合物を効率良くスクリーニングすることができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のタンパク質としては、
5 前記した本発明のタンパク質を含有するものであれば何れのものであってもよ
いが、本発明のタンパク質を含有する哺乳動物の臓器の細胞が好適である。し
かし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに
用いられるものとしては、ヒト由来のタンパク質を発現させた細胞などが適し
ている。

10 本発明のタンパク質を発現させた細胞を構築するには、前述の方法が用いら
れるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうこと
が好ましい。目的とするタンパク質部分をコードするDNA断片には相補D
NAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝
子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のタンパク質をコードするDNA
断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DN
A断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（
nuclear polyhedrosis virus; NPV）のポリヘドリンプロモーター、SV4
0由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロ
モーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモ
ーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現に用い
20 る細胞は本発明のタンパク質の発現が確認できるものであれば、いかなる細胞
であってもよいが、好ましくは、GABAトランスポーター活性の低い細胞が用い
られる。発現したGABAトランスポーターの量と質の検査はそれ自体公知の方法
で行なうことができる。例えば、標識化したGABAの細胞内への取り込み活性の測
定の方法（ジャーナル・バイオロジカル・ケミストリー（The Journal of
25 Biological Chemistry），第267巻，第29号，21098～21104頁（1992年））、標識

化したGABA取り込み阻害化合物の細胞への結合活性の測定の方法(ブレイン・リサーチ(Brain Research), 第647巻, 231~241頁(1994年))に従って行なうことができる。

より具体的には、まず、本発明のタンパク質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。GABAの取り込みに適当なバッファーに交換した後、試験化合物及び標識化したGABAを添加して一定時間インキュベートさせ、GABAの取り込みに適当なバッファーで洗浄する。その後、細胞に取り込まれた標識化したGABAの量を測定することによりスクリーニングできる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であつてもよい。

本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物は、例えば、不安、けいれん、てんかん、精神分裂病、脳血管障害や、脳性麻痺、痙性脊髄麻痺、変形性脊椎症、脊髄小脳変性症、多発性硬化症などに伴う痙性麻痺、緊張型頭痛、腰痛症、頸肩腕症候群などに対する安全で低毒性な医薬として有用である。

一方、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物は、例えば、アルツハイマーを含む痴呆症などに対する安全で低毒性な医薬として有用である。

また、本発明のタンパク質は浸透圧調節作用を有するため、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物は、腎尿管結石時の利尿、脳腫瘍時の脳圧降下、緑内障の眼圧降下、脳浮腫の予防・治療剤、脳圧、眼圧亢進状態の是正剤、乏尿、浮腫頭蓋内圧亢進、頭蓋内浮腫の治療剤、脳外科手術後の後療法剤、急性腎不全時の乏尿もしくは無尿の予防・治療剤として用いることができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質(好ましくは本発明のタンパク質発現細胞(具体的には、後述の実施例5で用いられるLM(T

K⁻細胞等)を含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

[スクリーニング用試薬]

①測定用緩衝液

5 GABA取り込み用Buffer(150mM NaCl、20mM HEPES、1mM CaCl₂、10mM Glucose
、5mM KCl、1mM MgCl₂、pH7.4に調製)

②[³H]-GABA

③本発明のタンパク質標品

本発明のタンパク質発現細胞

10 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物(予防・治療剤)として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

15 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的に投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、不安、てんかん、精神分裂病などの治療の目的で本発明のタンパク質に対する阻害剤を経口投与する場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき該阻害剤を約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～5.0mg、より好ましくは約1.0～2.0mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、不安、てんかん、精神分裂病などの治療の目的で本発明のタンパク質に対する阻害剤を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合は、一日につき該阻害剤を約0.01～3.0mg程度、好

ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(1a) GABAトランスポーター活性を変化させる化合物のスクリーニング方法

5 本発明のタンパク質を用いるか、または本発明のタンパク質の発現系を構築し、該発現系を用いたGABAトランスポーター活性測定系を用いるとともに、適宜、他のGABAトランスポーター活性を有するタンパク質（GAT-1、GAT-3、BGT-1など）の発現系を用いたGABAトランスポーター活性測定系を用いて、それぞれの活性を比較することによって、GABAトランスポーターの特定のサブタイプに特異的なGABAトランスポーター活性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

すなわち、本発明は、本発明のタンパク質を用いてGABAトランスポーター活性を測定することを特徴とするGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供するものである。

このような化合物には、本発明のタンパク質のGABAトランスポーター活性を増強し、他のタブタイプ（GAT-1、GAT-3、BGT-1など）のGABAトランスポーター活性を増強しない（または阻害しない）化合物、あるいは本発明のタンパク質のGABAトランスポーター活性を増強せず（または阻害せず）、他のタブタイプ（GAT-1、GAT-3、BGT-1など）のGABAトランスポーター活性を増強する化合物などが含まれる。

特に、本発明のタンパク質の発現系を用いたGABAトランスポーター活性測定系と、GAT-1またはGAT-3タンパク質の発現系を用いたGABAトランスポーター活性測定系を組み合わせて用いることが好ましい。

25 他のタブタイプ（GAT-1、GAT-3、BGT-1など）発現系を用いたGABAトランスポーター活性測定系は、本発明の蛋白質の発現系を用いたGABAトランスポーター

活性測定系と同様の方法により構築することができる。

このようにして得られたGABAトランスポーター活性を阻害する化合物は、例えば、不安、けいれん、てんかん、精神分裂病、脳血管障害や、脳性麻痺、痙性脊髄麻痺、変形性脊椎症、脊髄小脳変性症、多発性硬化症などに伴う痙性痺、緊張型頭痛、腰痛症、頸肩腕症候群などに対する安全で低毒性な医薬として有用である。
5

一方、GABAトランスポーター活性を促進する化合物は、例えば、アルツハイマーを含む痴呆症などに対する安全で低毒性な医薬として有用である。

また、本発明のタンパク質は浸透圧調節作用を有するため、GABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物は、腎尿管結石時の利尿、脳腫瘍時の脳圧降下、緑内障の眼圧降下、脳浮腫の予防・治療剤、脳圧、眼圧亢進状態の是正剤、乏尿、浮腫頭蓋内圧亢進、頭蓋内浮腫の治療剤、脳外科手術後の後療法剤、急性腎不全時の乏尿もしくは無尿の予防・治療剤として用いることができる。
10

15 本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質（好ましくは本発明のタンパク質発現細胞および他のタブタイプ（GAT-1、GAT-3、BGT-1など）タンパク質（好ましくは、他のタブタイプ（GAT-1、GAT-3、BGT-1など）タンパク質発現細胞（具体的には、後述の実施例5で用いられるLM（TK-細胞等））を含有するものである。

20 本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

[スクリーニング用試薬]

①測定用緩衝液

GABA取り込み用Buffer(150mM NaCl、20mM HEPES、1mM CaCl₂、10mM Glucose、5mM KCl、1mM MgCl₂、pH7.4に調製)

25 ②[³H]-GABA

③本発明のタンパク質標品および他のタブタイプ（GAT-1、GAT-3、BGT-1など）

タンパク質標品

本発明のタンパク質発現細胞および他のタブタイプ (GAT-1、GAT-3、BGT-1など) タンパク質

該スクリーニング方法をまたはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、不安、てんかん、精神分裂病などの治療の目的で本発明のタンパク質に対する阻害剤を経口投与する場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき該阻害剤を約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、不安、てんかん、精神分裂病などの治療の目的で本発明のタンパク質に対する阻害剤を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合は、一日につき該阻害剤を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(2) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明の抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、

5 (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

10 上記 (ii) においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 Fab' 、あるいは Fab 画分を用いてもよい。本発明のタンパク質に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、本発明のタンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイツ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

20 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラク

トシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

- 本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（F）と、抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B／F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B／F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。
- 10 イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。
- 15 また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。
- これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参考することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和

57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモノジー(Methods in ENZYMOLOGY)」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)など参照)。

10 以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

(3) 中和抗体

本発明の抗体のうち本発明のタンパク質の細胞外領域に結合し、本発明のタンパク質の機能(例えば、GABAトランスポーター活性)を抑制できる中和抗体は、不安、けいれん、てんかん、精神分裂病、脳血管障害や、脳性麻痺、痙性脊髄麻痺、変形性脊椎症、脊髄小脳変性症、多発性硬化症などに伴う痙性麻痺、緊張型頭痛、腰痛症、頸肩腕症候群などの治療・予防剤として使用することができる。本発明の抗体は、そのまで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、ヒトまたは温血動物に投与できる。

(4) アンチセンスDNA

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における本発明のタンパク質またはDNAの機能を抑制することができるので、不安、けいれん、てんかん、精神分裂病、脳血管障害や、脳性麻痺、痙性脊髄麻痺、変形性脊椎症、脊髄小脳変性症、多発性硬化症などに伴う痙性麻痺、緊張型頭痛、腰痛症、頸肩腕症候群などの治療

・予防剤として使用することができる。

上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合、本発明のアンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従ってヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のアンチセンスDNAは、そのまで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）に実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約95%以上、好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約95%以上、好ましくは約98%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

（5）本発明のタンパク質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製

本発明のDNAを用いて、本発明のタンパク質を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）

など（以下、動物と略記する）が挙げれるが、特に、マウス、ラットなどが好適である。

本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、マウス由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来のプロモーターであって、本発明のDNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のタンパク質を高産生するDNA転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうる。

受精卵細胞段階における本発明のDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のタンパク質が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のタンパク質を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のタンパク質を有する。

本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明のDNAが転移された動物は、本発明のタンパク質が高発現させられているので、本発明のタンパク質に作用する薬剤のスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のタンパク質が存在する組織を分析することにより、本発明のタンパク質について分析すること 5 ができる。本発明のタンパク質を有する組織の細胞を標準組織培養技術により 培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のタンパク質を単離精製す 10 ることも可能である。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、 IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示 15 すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
c DNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
20 G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
25 dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸

	d C T P	: デオキシシチジン三リン酸
	A T P	: アデノシン三リン酸
	E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
	S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
5	G l y	: グリシン
	A l a	: アラニン
	V a l	: バリン
	L e u	: ロイシン
	I l e	: イソロイシン
10	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
15	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
20	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
25	p G l u	: ピログルタミン酸
	M e	: メチル基

E t : エチル基
 B u : ブチル基
 P h : フェニル基
 T C : チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

5 また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

T o s : p-トルエンスルfonyl
 C H O : ホルミル
 B z l : ベンジル
 10 C l₂BzI : 2, 6-ジクロロベンジル
 B o m : ベンジルオキシメチル
 Z : ベンジルオキシカルボニル
 C 1-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル
 B r-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
 15 B o c : t-ブトキシカルボニル
 D N P : ジニトロフェニル
 T r t : トリチル
 B u m : t-ブトキシメチル
 F m o c : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
 20 H O B t : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
 H O O B t : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-
 1, 2, 3-ベンゾトリアジン
 H O N B : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシミド
 D C C : N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド

25 本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

以下の実施例 3 で得られたヒトGAT2遺伝子がコードする本発明タンパク質コードするアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2]

以下の実施例 3 で得られたヒトGAT2遺伝子がコードする塩基配列を示す。

5 [配列番号：3]

以下の実施例 1 で用いられたプライマーHGA2Uの塩基配列を示す。

[配列番号：4]

以下の実施例 1 で用いられたプライマーHGA2Lの塩基配列を示す。

[配列番号：5]

10 以下の実施例 2 で用いられたプライマーHGA2-198Lの塩基配列を示す。

[配列番号：6]

以下の実施例 2 で用いられたプライマーHGA2-247Lの塩基配列を示す。

[配列番号：7]

以下の実施例 2 で用いられたプライマーHGA2-1665Uの塩基配列を示す。

15 [配列番号：8]

以下の実施例 2 で用いられたプライマーHGA2-1613Uの塩基配列を示す。

[配列番号：9]

以下の実施例 2 で用いられたプライマーAP-1の塩基配列を示す。

[配列番号：10]

20 以下の実施例 2 で用いられたプライマーAP-2の塩基配列を示す。

[配列番号：11]

以下の実施例 3 で用いられたプライマーHGA2-U2の塩基配列を示す。

[配列番号：12]

以下の実施例 3 で用いられたプライマーHGA2-L2の塩基配列を示す。

25 後述の実施例 4 で得られたプラスミドpMCMV-hGAT2を保持する形質転換体エ
シエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 α / pMCMV-hGAT2は、1999年6

月2日から日本国茨城県つくば市東1-1-3、通商産業省工業技術院生命工
学工業技術研究所（N I B H）に寄託番号 F E R M B P - 6 7 3 9 として、1
9 9 9 年 4 月 2 8 日から日本国大阪府大阪市十三本町 2 - 1 7 - 8 5、財団法
人・発酵研究所（I F O）に寄託番号 I F O 1 6 2 8 6 として寄託されている
5。

実施例

以下の実施例に記載の遺伝子操作法は、成書（Maniatisら、モレキュラー・
クローニング、Cold Spring Harbor Laboratory、1989年）に記載されている方
10 法もしくは試薬の添付プロトコールに記載されている方法に従った。

実施例 1 ヒトGAT2遺伝子の部分的クローニング

ヒトGAT2遺伝子の部分的なクローニングは、ヒト網膜cDNA（東洋紡、QUICK-
Clone cDNA）を鑄型とし、Bordenらが報告（J. Biol. Chem. 267, 21098-21104 (1992)
）しているラットGAT2遺伝子の塩基配列を参考に作製したプライマーセット

15 HGA2U 5'-GGT GGG ATG GAT AAC AGG GTC TCG GGA ACG [配列番号：3]

HGA2L 5'-CCC TAG CAG TTA GAC TCC AGT TCT GTG AGC [配列番号：4]

を用いたPCR法により行った。

PCR 反応は AmpliWax PCR Gem 100（宝酒造）を用いた Hot Start法で行った
。下層混液として、10 x LA PCR Buffer 2ml、2.5mM dNTP 溶液 3ml、25mM MgCl₂
20 2ml、プライマー溶液（[配列番号3]及び [配列番号4]）各2.5ml、滅菌蒸留水 8ml

を混合した。上層混液としては、鑄型としてヒト網膜cDNA(1 ng/ml)を1ml、10x

LA PCR Buffer 3ml、2.5mM dNTP 溶液 1ml、25mM MgCl₂ 3ml、TaKaRa LA Taq DNA

polymerase（宝酒造） 0.5ml、滅菌蒸留水 21.5mlを混合した。調製した下層混

液に AmpliWax PCR Gem 100（宝酒造）を 1 個添加し、70°C で 5 分間、水中で

25 5 分間処理後、上層混液を加え PCRの反応液を調製した。反応液の入ったチュー
プをサーマルサイクラー（パーキンエルマー社）にセットした後、95°Cで2分間

処理した。さらに、98°Cで10秒間、60°Cで30秒間、72°Cで2分間のサイクルを45回繰り返した後、72°Cで8分間処理した。得られたPCR産物をアガロースゲル(1%)電気泳動し、GAT2遺伝子を含む1.8kbのDNA断片をゲルから回収した後、pT7Blue vector(宝酒造)に挿入することによりプラスミドpT7-GAT2を作製した。

- 5 pT7-GAT2のPCR断片部分の塩基配列を確認したところ、ラットGAT2遺伝子と類似した配列を有していた。

実施例2 ヒトGAT2遺伝子の5'及び3'領域のクローニング

実施例1で得られたPCR断片の配列の5'及び3'領域部分はラットGAT2遺伝子の配列である。よって、ヒトGAT2遺伝子の5'及び3'領域をクローニングするため、網膜及び腎臓cDNA(東洋紡 Marathon Ready cDNA)を鋳型とし、pT7-GAT2の塩基配列を参考に作製した特異的プライマーセット

HGA2-198L 5'-GCA CCT CCC CCA TTT TTG TAG CAG [配列番号：5]

HGA2-247L 5'-GAC AGG AAT GCC ACA GGT AAA GAG [配列番号：6]

HGA2-1665U 5'-CTC TAC AGA CTC GGA ACC CTC AAG [配列番号：7]

15 HGA2-1613U 5'-CCT GGG CTG GCT CCT GGC TCT GTC [配列番号：8]

及びMarathon Ready cDNAに添付されているプライマーセット

AP-1 5'-CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC [配列番号：9]

AP-2 5'-ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC [配列番号：10]

20 を用いたRACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法によるnested PCR法で行った。

5'領域の1回目のPCR 反応は AmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を用いた Hot Start法で行った。下層混液として、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 2ml、2.5mM dNTP溶液 3ml、プライマー溶液(HGA2-247L [配列番号：6] 及びAP-1 [配列番号：9])各 1ml、滅菌蒸留水 13mlを混合した。上層混液としては、鋳型としてヒト網膜及び腎臓cDNAを5ml、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 3ml、2.5mM dNTP溶液 1ml、pyrobest DNA polymerase (宝酒造) 0.5ml、滅菌蒸留水

20. 5mlを混合した。調製した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100（宝酒造）を 1 個添加し、70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加えPCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー（パーキンエルマー社）にセットした後、94℃で2分間処理した。さらに、94℃で5秒間、72℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、70℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、68℃で3分間を25サイクル行った。次いで、得られたPCR産物を鋳型としたnested PCRを行った。すなわち、下層混液として、10x LA PCR Buffer 2ml、2.5mM dNTP溶液 3ml、25mM MgCl₂ 2ml、プライマー溶液(HGA2-198L[配列番号：5]及びAP-2[配列番号：10])各 1ml、滅菌蒸留水 11mlを混合した。上層混液としては、鋳型として5'領域のHGA2-247L及びAP-1のPCR産物を1ml、10x LA PCR Buffer 3ml、2.5mM dNTP溶液 1ml、25mM MgCl₂ 3ml、TaKaRa LA Taq DNA polymerase（宝酒造） 0.5ml、滅菌蒸留水 21.5mlを混合した。調製した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100（宝酒造）を1個添加し、70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加えPCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー（パーキンエルマー社）にセットした後、94℃で2分間処理した。さらに、94℃で5秒間、72℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、70℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、68℃で3分間を25サイクル行った。

3'領域の1回目のPCR反応は AmpliWax PCR Gem 100(宝酒造)を用いた Hot Start 法で行った。下層混液として、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 2ml、2.5mM dNTP溶液 3ml、プライマー溶液(HGA2-1613U[配列番号：8]及びAP-1[配列番号：9])各 1ml、滅菌蒸留水 13mlを混合した。上層混液としては、鋳型としてヒト網膜及び腎臓cDNAを5ml、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 3ml、2.5mM dNTP溶液 1ml、pyrobest DNA polymerase（宝酒造） 0.5ml、滅菌蒸留水 20.5mlを混合した。調製した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100（宝酒造）を 1 個添加し、70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加えPCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー（パーキンエルマー社）にセ

ットした後、94℃で2分間処理した。さらに、94℃で5秒間、72℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、70℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、68℃で3分間を25サイクル行った。次いで、得られたPCR産物を鋳型としたnested PCRを行った。すなわち、下層混液として、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 2ml、2.5mM dNTP溶液 3ml、プライマー溶液(HGA2-1665U[配列番号：7]及びAP-2[配列番号：10])各 1ml、滅菌蒸留水 13mlを混合した。上層混液としては、鋳型として3'領域のHGA2-1613U及びAP-1のPCR産物を1ml、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 3ml、2.5 mM dNTP溶液 1ml、pyrobest DNA polymerase (宝酒造) 0.5ml、滅菌蒸留水 24.5mlを混合した。調製した下層混液にAmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を1個添加し、70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加えPCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー(パーキンエルマー社)にセットした後、94℃で2分間処理した。さらに、94℃で5秒間、72℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、70℃で3分間を5サイクル、94℃で5秒間、68℃で3分間を25サイクル行った。

得られたそれぞれのPCR産物のダイレクトシーケンスを行った結果、ラットGAT2遺伝子の5'及び3'領域と類似した配列を有していた。

実施例3 ヒトGAT2遺伝子全長のクローニング

ヒトGAT2遺伝子全長のクローニングは、ヒト腎臓QUICK-Clone cDNA(東洋紡)とヒト網膜及び腎臓Marathon Ready cDNA(東洋紡)の異なる3種類の鋳型を用いて、実施例2で得られた5'及び3'領域の塩基配列を参考に作製した特異的プライマーセット

HGA2-U2 5'-GGC AGC GCT AGC AGG TCT GGC AGC AGC TTC ACT AAG [配列番号：11]

HGA2-L2 5'-TCA CCA GTC GAC GGC ACA CAG GCA CCA TCC AAG GGC [配列番号：12]
によりPCR法を行った。

PCR反応はAmpliWax PCR Gem 100 (宝酒造) を用いたHot Start法で行った。

ヒト腎臓QUICK-Clone cDNA(東洋紡)を鋳型とした場合、下層混液として、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 2ml、2.5mM dNTP溶液3ml、プライマー溶液(配列番号11)及び(配列番号12)各1ml、滅菌蒸留水13mlを混合した。上層混液としては、鋳型1ml、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 3ml、2.5mM dNTP溶液1ml、pyrobest DNA polymerase(宝酒造)0.5ml、滅菌蒸留水24.5mlを混合した。調製した下層混液にAmpliWax PCR Gem 100(宝酒造)を1個添加し、70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加えPCRの反応液を調製した。ヒト網膜及び腎臓Marathon Ready cDNA(東洋紡)を鋳型とした場合、下層混液として、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 2ml、2.5mM dNTP溶液3ml、プライマー溶液各1ml、滅菌蒸留水13mlを混合した。上層混液としては、鋳型を5ml、10x pyrobest DNA polymerase Buffer 3ml、2.5mM dNTP溶液1ml、pyrobest DNA polymerase(宝酒造)0.5ml、滅菌蒸留水20.5mlを混合した。調製した下層混液にAmpliWax PCR Gem 100(宝酒造)を1個添加し、70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加えPCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー(パーキンエルマー社)にセットした後、95℃で2分間処理した。さらに、98℃で10秒間、60℃で30秒間、72℃で2分間のサイクルを45回繰り返した後、72℃で8分間処理した。それぞれの得られたPCR産物をアガロースゲル(1%)電気泳動し、ヒトGAT2遺伝子を含む1.8kbのDNA断片をゲルから回収した後、pT7Blue vector(宝酒造)に挿入することによりヒト腎臓QUICK-Clone cDNA由来のpT7-hGAT2 No.1-11、ヒト腎臓Marathon Ready cDNA由来のpT7-hGAT2 No.3-6及びヒト網膜Marathon Ready cDNA由来のpT7-hGAT2 No.4-13を作製した。

3種類の異なる鋳型由来のPCR断片部分の塩基配列は、すべて一致したことからヒトGAT2遺伝子[配列番号：2]を取得したことを確認した。

25 実施例4 ヒトGAT2発現用プラスミドの作製

プラスミドpMCMVneoの5.6Kb NheI-SalI断片と実施例3記載のプラスミド

pT7-hGAT2 No. 4-13のヒトGAT2遺伝子を含む1.8Kb NheI-SalI断片を連結し、プラスミドpMCMV-hGAT2を作製した。

プラスミドpMCMV-hGAT2を用いて大腸菌Escherichia coli DH5 α 株を形質転換してEscherichia coli DH5 α / pMCMV-hGAT2を得た。

5 実施例5 ヒトGAT2発現用プラスミドのLM(TK $^{-}$)細胞への導入と発現細胞の取得

10% ウシ胎児血清(ライフテックオリエンタル)を含むDMEM培地(ライフテックオリエンタル)を用いてティッシュカルチャーフラスコ750ml(コーニング)で生育させたLM(TK $^{-}$)細胞を0.5g/Lトリプシン-0.2g/L EDTA(ライフテックオリエンタル)処理により剥がした後、細胞をPBS(ライフテックオリエンタル)で

10 洗浄して遠心(1000rpm, 5分)し、PBSで懸濁した。次に、ジーンパルサー(バイオラッド社)を用いて、下記の条件に従って、DNAを細胞に導入した。即ち、0.4cmギャップのキュベットに 8×10^6 細胞と10mgの発現用プラスミドpMCMV-hGAT2を加え、電圧0.25kV、キャパシタンス960mF下でエレクトロポレーションした。その後、10% ウシ胎児血清を含むDMEM培地に細胞を移し、24時間培養し、再び細胞を剥がして遠心し、次に、ジェネティシン(ライフテックオリエンタル)を500mg/mlに加えた10% ウシ胎児血清を含むDMEM培地で懸濁し、 10^4 細胞/mlとなるように希釈して96ウェルプレート(ベクトンディキンソン)に播種して、37°Cの炭酸ガスインキュベーター中で培養することによりジェネティシン耐性形質転換株を得た。

20 ついで、GAT2発現を以下の方法で確認した。すなわち、得られた形質転換株を96ウェルプレート(コーニング)で培養した後、GABA取り込み用Buffer(150mM NaCl、20mM HEPES、1mM CaCl₂、10mM Glucose、5mM KCl、1mM MgCl₂、pH7.4に調製)に置換し、50nM [³H]-GABA添加により、[³H]-GABAが取り込まれる細胞株、hGAT2/LM(TK $^{-}$)を選択した(図2)。

本発明のタンパク質またはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、およびそれらをコードするDNAは、抗体および抗血清の入手、本発明のタンパク質の発現系の構築、同発現系を用いたGABAトランスポーターの活性を測定する系の構築と医薬品候補化合物のスクリーニング、GABAトランスポーターの立体構造にもとづいたドラッグデザインの実施、遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーを作成するための試薬、トランスジェニック動物の作製または遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして用いることができる。

請求の範囲

1. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
2. GABAトランスポーター活性を有する請求項1記載のタンパク質またはその塩。
3. 請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
4. 請求項1記載のタンパク質または請求項3記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。
- 10 5. 配列番号：2で表わされる塩基配列を有する請求項4記載のDNA。
6. 請求項4記載のDNAを含有する組換えベクター。
7. 請求項6記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
8. 請求項7記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のタンパク質または請求項3記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載のタンパク質またはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。
- 15 9. 請求項1記載のタンパク質もしくはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。
10. 請求項1記載のタンパク質またはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いてGABAトランスポーター活性を測定することを特徴とするGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 20 11. 請求項1記載のタンパク質またはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載のタンパク質またはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩のGABAト

ンスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

12. 請求項1記載のタンパク質またはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる

5 GABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

13. 請求項1記載のタンパク質またはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる

請求項1記載のタンパク質またはその塩、または請求項3記載の部分ペプチド

10 もしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩のGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

14. 請求項10記載のスクリーニング方法または請求項12記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、GABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

15. 請求項11記載のスクリーニング方法または請求項13記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のタンパク質またはその塩、または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩のGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

20 16. 請求項10記載のスクリーニング方法または請求項12記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、GABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

17. 請求項11記載のスクリーニング方法または請求項13記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のタンパク質またはその塩、

25 または請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩のGABAトランスポーター活性を促進または阻害する化合物または

その塩を含有してなる医薬。

18. 不安症、痙攣、てんかん、精神分裂病、脳血管障害、脳性麻痺、痙性脊

髓麻痺、変形性脊椎症、脊髓小脳変性症、多発性硬化症に伴う痙性麻痺、緊張

型頭痛、腰痛症、頸肩腕症候群の予防・治療剤である、請求項1記載のタンパ

ク質またはその塩、請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくは

そのエステルまたはその塩のGABAトランスポーター活性を阻害する化合物また

はその塩を含有してなる医薬。

19. 痴呆症の予防・治療剤である、請求項1記載のタンパク質またはその塩

、請求項3記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまた

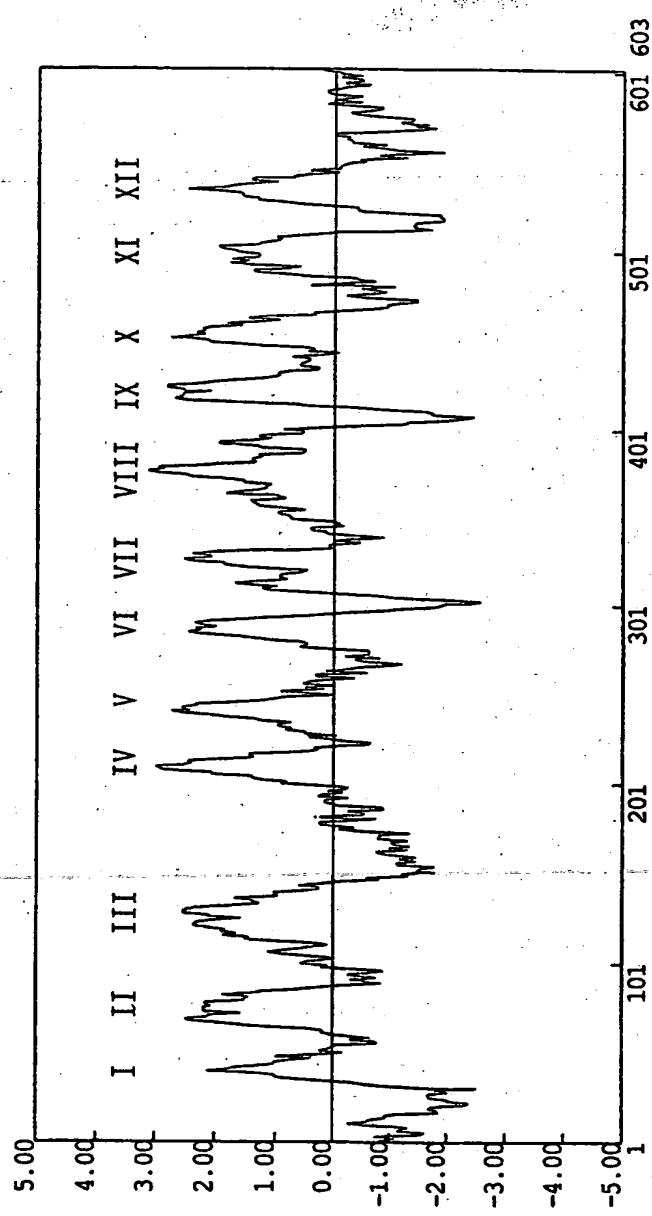
10. はその塩のGABAトランスポーター活性を促進する化合物またはその塩を含有し
てなる医薬。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/2

図

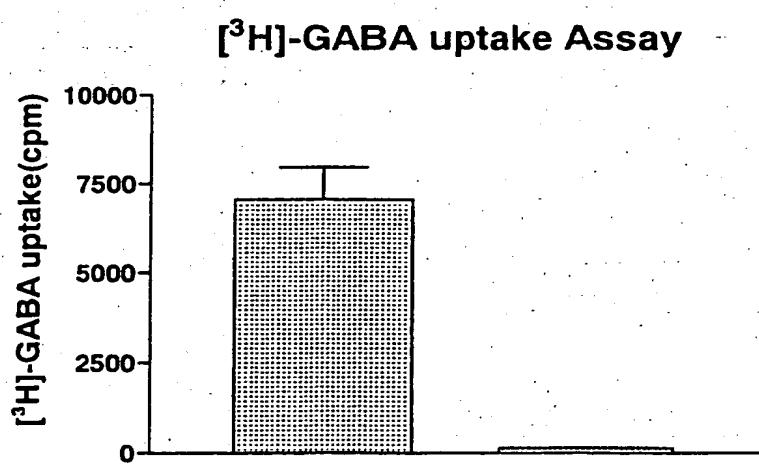
1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/2

図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Protein and its DNA

<130> 2613WOOP

<150> JP 11-163924

<151> 1999-06-10

<160> 12

<210> 1

<211> 602

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Asp Ser Arg Val Ser Gly Thr Thr Ser Asn Gly Glu Thr Lys Pro

1 5 10 15

Val Tyr Pro Val Met Glu Lys Lys Glu Glu Asp Gly Thr Leu Glu Arg

20 25 30

Gly His Trp Asn Asn Lys Met Glu Phe Val Leu Ser Val Ala Gly Glu

35 40 45

Ile Ile Gly Leu Gly Asn Val Trp Arg Phe Pro Tyr Leu Cys Tyr Lys

50 55 60

Asn Gly Gly Gly Ala Phe Phe Ile Pro Tyr Leu Val Phe Leu Phe Thr

65 70 75 80

Cys Gly Ile Pro Val Phe Leu Leu Glu Thr Ala Leu Gly Gln Tyr Thr

85 90 95

Ser Gln Gly Gly Val Thr Ala Trp Arg Lys Ile Cys Pro Ile Phe Glu

100 105 110

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/8

Gly Ile Gly Tyr Ala Ser Gln Met Ile Val Ile Leu Leu Asn Val Tyr

115 120 125

Tyr Ile Ile Val Leu Ala Trp Ala Leu Phe Tyr Leu Phe Ser Ser Phe

130 135 140

Thr Ile Asp Leu Pro Trp Gly Gly Cys Tyr His Glu Trp Asn Thr Glu

145 150 155 160

His Cys Met Glu Phe Gln Lys Thr Asn Gly Ser Leu Asn Gly Thr Ser

165 170 175

Glu Asn Ala Thr Ser Pro Val Ile Glu Phe Trp Glu Arg Arg Val Leu

180 185 190

Lys Ile Ser Asp Gly Ile Gln His Leu Gly Ala Leu Arg Trp Glu Leu

195 200 205

Ala Leu Cys Leu Leu Ala Trp Val Ile Cys Tyr Phe Cys Ile Trp

210 215 220

Lys Gly Val Lys Ser Thr Gly Lys Val Val Tyr Phe Thr Ala Thr Phe

225 230 235 240

Pro Tyr Leu Met Leu Val Val Leu Leu Ile Arg Gly Val Thr Leu Pro

245 250 255

Gly Ala Ala Gln Gly Ile Gln Phe Tyr Leu Tyr Pro Asn Leu Thr Arg

260 265 270

Leu Trp Asp Pro Gln Val Trp Met Asp Ala Gly Thr Gln Ile Phe Phe

275 280 285

Ser Phe Ala Ile Cys Leu Gly Cys Leu Thr Ala Leu Gly Ser Tyr Asn

290 295 300

Lys Tyr His Asn Asn Cys Tyr Arg Asp Cys Ile Ala Leu Cys Phe Leu

305 310 315 320

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/8

Asn Ser Gly Thr Ser Phe Val Ala Gly Phe Ala Ile Phe Ser Ile Leu

325

330

335

Gly Phe Met Ser Gln Glu Gln Gly Val Pro Ile Ser Glu Val Ala Glu

340

345

350

Ser Gly Pro Gly Leu Ala Phe Ile Ala Tyr Pro Arg Ala Val Val Met

355

360

365

Leu Pro Phe Ser Pro Leu Trp Ala Cys Cys Phe Phe Phe Met Val Val

370

375

380

Leu Leu Gly-Leu Asp Ser Gln Phe Val Cys Val Glu Ser Leu Val Thr

385

390

395

400

Ala Leu Val Asp Met Tyr Pro His Val Phe Arg Lys Lys Asn Arg Arg

405

410

415

Glu Val Leu Ile Leu Gly Val Ser Val Val Ser Phe Leu Val Gly Leu

420

425

430

Ile Met Leu Thr Glu Gly Gly Met Tyr Val Phe Gln Leu Phe Asp Tyr

435

440

445

Tyr Ala Ala Ser Gly Met Cys Leu Leu Phe Val Ala Ile Phe Glu Ser

450

455

460

Leu Cys Val Ala Trp Val Tyr Gly Ala Lys Arg Phe Tyr Asp Asn Ile

465

470

475

480

Glu Asp Met Ile Gly Tyr Arg Pro Trp Pro Leu Ile Lys Tyr Cys Trp

485

490

495

Leu Phe Leu Thr Pro Ala Val Cys Thr Ala Thr Phe Leu Phe Ser Leu

500

505

510

Ile Lys Tyr Thr Pro Leu Thr Tyr Asn Lys Lys Tyr Thr Tyr Pro Trp

515

520

525

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 8

Trp Gly Asp Ala Leu Gly Trp Leu Leu Ala Leu Ser Ser Met Val Cys

530

535

540

Ile Pro Ala Trp Ser Leu Tyr Arg Leu Gly Thr Leu Lys Gly Pro Phe

545

550

555

560

Arg Glu Arg Ile Arg Gln Leu Met Cys Pro Ala Glu Asp Leu Pro Gln

565

570

575

Arg Asn Pro Ala Gly Pro Ser Ala Pro Ala Thr Pro Arg Thr Ser Leu

580

585

590

Leu Arg Leu Thr Glu Leu Glu Ser His Cys

595

600

<210> 2

<211> 1806

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

ATGGATAGCA GGGTCTCAGG CACAACCGT AATGGAGAGA CAAAACCGT GTATCCAGTC	60
ATGGAAAAGA AGGAGGAAGA TGGCACCCCTG GAGCGGGGGC ACTGGAACAA CAAGATGGAG	120
TTTGTGCTGT CAGTGGCTGG GGAGATCATT GGCTTAGGCA ACGTCTGGAG GTTCCCTAT	180
CTCTGCTACA AAAATGGGGG AGGTGCCTTC TTCATCCCCT ACCTCGTCTT CCTCTTTACC	240
TGTGGCATTG CTGTCTTCCT TCTGGAGACA GCACTAGGCC AGTACACTAG CCAGGGAGGC	300
GTCACAGCCT GGAGGAAGAT CTGCCCATC TTTGAGGGCA TTGGCTATGC CTCCCAGATG	360
ATCGTCATCC TCCTAACGT CTACTACATC ATTGTGTGG CCTGGGGCCCT GTTCTACCTC	420
TTCAGCAGCT TCACCATCGA CCTGCCCTGG GGCGGCTGCT ACCATGAGTG GAACACAGAA	480
CACTGTATGG AGTTCCAGAA GACCAACGGC TCCCTGAATG GTACCTCTGA GAATGCCACC	540
TCTCCTGTCA TCGAGTTCTG GGAGCGGCCGG GTCTTGAAGA TCTCTGATGG GATCCAGCAC	600
CTGGGGGCCCTGG GCTGGCTCTG TGCCCTCTGC TGGCCTGGGT CATCTGCTAC	660

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 / 8

TTCTGCATCT GGAAGGGGGT GAAGTCCACA GGCAAGGTGG TGTACTTCAC GGCCACATT 720
CCTTACCTCA TGCTGGTGGT CCTGTTAATT CGAGGGGTGA CGTTGCCCTGG GGCAGCCCCAA 780
GGAATTCACT TTTACCTGTA CCCAACCTC ACGCGTCTGT GGGATCCCCA GGTGTGGATG 840
GATGCAGGCA CCCAGATATT CTTCTCCTTC GCCATCTGTC TTGGGTGCCT GACAGCCCTG 900
GGCAGCTACA ACAAGTACCA CAACAACCTGC TACAGGGACT GCATGCCCT CTGCTTCCTC 960
AACAGCGGCA CCAGCTTGT GGCGGGCTTT GCCATCTTCT CCATCCTGGG CTTCATGTCT 1020
CAGGAGCAGG GGGTGCCCAT TTCTGAGGTG GCCGAGTCAG GCCCTGGCCT GGCTTCATC 1080
GCTTACCCGC GGGCTGTGGT GATGCTGCC TTCTCTCCTC TCTGGGCCTG CTGTTCTTC 1140
TTCATGGTCG TTCTCCTGGG ACTGGATAGC CAGTTGTGT GTGTAGAAAG CCTGGTGACA 1200
GCGCTGGTGG ACATGTACCC TCACGTGTTG CGCAAGAAGA ACCGGAGGGA AGTCCTCATC 1260
CTTGGAGTAT CTGTCGTCTC CTTCTTGTG GGGCTGATCA TGCTCACAGA GGGCGGAATG 1320
TACGTGTTCC AGCTCTTGA CTACTATGCG GCCAGTGGCA TGTGCCTCCT GTTCGTGGCC 1380
ATCTTCGAGT CCCTCTGTGT GGCTTGGTT TACGGAGCCA AGCGCTTCTA CGACAACATC 1440
GAAGACATGA TTGGGTACAG GCCATGGCCT CTTATCAAAT ACTGTTGGCT CTTCCTCACA 1500
CCAGCTGTGT GCACAGCCAC CTTCTCTTC TCCCTGATAA AGTACACTCC GCTGACCTAC 1560
AACAAAGAAGT ACACGTACCC GTGGTGGGGC GATGCCCTGG GCTGGCTCCT GGCTCTGTCC 1620
TCCATGGTCT GCATTCTGC CTGGAGCCTC TACAGACTCG GAACCCCTAA GGGCCCTTC 1680
AGAGAGAGAA TCCGTCAGCT CATGTGCCA GCCGAGGACC TGCCCCAGCG GAACCCAGCA 1740
GGACCCCTCGG CTCCCAGCCAC CCCCAGGACC TCACTGCTCA GACTCACAGA GCTAGAGTCT 1800
CACTGC

1806

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6 / 8

<223> Primer

<400> 30

GGTGGGATGG ATAACAGGGT CTCGGGAACG

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

CCCTAGCA GT TAGACTCCAG TTCTGTGAGC

30

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 5

GCACCTCCCC CATTGGTA GCAG

24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7 / 8

GACAGGAATG CCACAGGTAA AGAG

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 7

CTCTACAGAC TCGGAACCCCT CAAG

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

CCTGGGCTGG CTCCCTGGCTC TGTC

24

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

CCATCCTAAT ACCGACTCACT ATAGGGC

27

<210> 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8 / 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 10

ACTCACTATA GGGCTCGAGC GGC

23

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 11

GGCAGCGCTA GCAGGTCTGG CAGCAGCTTC ACTAAG

36

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

TCACCAGTCG ACGGCACACA GGCACCATCC AAGGGC

36

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03720

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18; A61P25/28, A61P25/00, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, A61P25/28, A61P25/00, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Liu, Q-R. et al. "Molecular characterization of four pharmacologically distinct α -aminobutyric acid transporters in mouse brain", The Journal of Biological Chemistry (1993) Vol.268, No.3, P.2106-2112	1-19
X	Borden, L. A. et al. "Molecular heterogeneity of the γ -aminobutyric acid (GABA) transport system", The Journal of Biological Chemistry (1992) Vol.267, No.29, P.21098-21104	1-19
X	Borden, L. A. et al. "Cloning and expression of a betaine/GABA transporter from human brain", Journal of Neurochemistry (1995) Vol.64, No.3, P.977-984	1-19
X	Rasola, A. et al. "Molecular cloning and functional characterization of a GABA/betaine transporter from human kidney", FEBS Letters (1995) Vol.373, No.3, P.229-233	1-19
X	WO, 96/04790, A1 (Synaptic Pharmaceutical Corporation), 22 February, 1996 (22.02.96) & AU, 9533684, A & US, 5766848, A	1-19

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 September, 2000 (13.09.00)Date of mailing of the international search report
26 September, 2000 (26.09.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone N .

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03720

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, 5658786, A (Synaptic Pharmaceutical Corporation), 19 August, 1997 (19.08.97) & WO, 93/18143, A1 & AU, 9337893, A & EP, 631623, A1 & JP, 7-507446, W & AU, 691469, B & AU, 9880906, A & AU, 707934, B	1-19
X	US, 5712148, A (Synaptic Pharmaceutical Corporation), 27 January, 1998 (27.01.98) & WO, 94/15618, A1 & AU, 9460827, A & EP, 678028, A1 & US, 5712148, A	1-19
P,X	Bolvig, T. et al. "Action of bicyclic isoxazole GABA analogues on GABA transporters and its relation to anticonvulsant activity" European Journal of Pharmacology (30 June, 1999) Vol. 375, No. 1-3, P.367-374	1-19

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/03720

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, A61P25/28, A61P25/00
G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, A61P25/28, A61P25/00
G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Liu, Q-R. et al. "Molecular characterization of four pharmacologically distinct α -aminobutyric acid transporters in mouse brain" The Journal of Biological Chemistry (1993) Vol. 268 No. 3 P. 2106-2112	1-19
X	Borden, L.A. et al. "Molecular heterogeneity of the γ -aminobutyric acid (GABA) transport system" The Journal of Biological Chemistry (1992) Vol. 267 No. 29 P. 21098-21104	1-19

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.09.00

国際調査報告の発送日

26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

六笠 紀子

印 4B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き)引用文献の カテゴリー*	関連すると認められる文献 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Borden, L. A. et al. "Cloning and expression of a betaine/GABA transporter from human brain" Journal of Neurochemistry (1995) Vol. 64 No. 3 P. 977-984	1-19
X	Rasola, A. et al. "Molecular cloning and functional characterization of a GABA/betaine transporter from human kidney" FEBS Letters (1995) Vol. 373 No. 3 P. 229-233	1-19
X	WO, 96/04790, A1 (Synaptic Pharmaceutical Corporation) 22. 2月. 1996 (22. 02. 96) & AU, 9533684, A & US, 5766848, A	1-19
X	US, 5658786, A (Synaptic Pharmaceutical Corporation) 19. 8月. 1997 (19. 08. 97) & WO, 93/18143, A1 & AU, 9337893, A & EP, 631623, A1 & JP, 7-507446, W & AU, 691469, B & AU, 9880906, A & AU, 707934, B	1-19
X	US, 5712148, A (Synaptic Pharmaceutical Corporation) 27. 1月. 1998 (27. 01. 98) & WO, 94/15618, A1 & AU, 9460827, A & EP, 678028, A1	1-19
P, X	Bolvig, T. et al. "Action of bicyclic isoxazole GABA analogues on GABA transporters and its relation to anticonvulsant activity" European Journal of Pharmacology (30. June, 1999) Vol. 375 No. 1-3 P. 367-374	1-19